



Dynasweet - Les glycodyn[n]arènes comme ligands multivalents de lectines : une étude par chimie combinatoire dynamique

Yoann Pascal

► To cite this version:

Yoann Pascal. Dynasweet - Les glycodyn[n]arènes comme ligands multivalents de lectines : une étude par chimie combinatoire dynamique. Chimie organique. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1288 . tel-02076550

HAL Id: tel-02076550

<https://theses.hal.science/tel-02076550>

Submitted on 22 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie, Procédés, Environnement

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie Organique

Soutenue publiquement le 11/12/2018, par :
Yoann Pascal

Dynasweet-Les glycodyn[n]arènes comme ligands multivalents de lectines : Une étude par chimie combinatoire dynamique

Devant le jury composé de :

Imberty, Anne	Directrice de recherche CNRS Université Grenoble-Alpes	Rapporteuse
Ulrich, Sébastien	Chargé de recherche CNRS Université de Montpellier	Rapporteur
Hirsch, Anna	Professeure Université de Saarland	Examinatrice
Sollogoub, Matthieu	Professeur Sorbonne université	Examinateur
Demesmay-Guilhin, Claire	Professeure Université de Lyon	Examinatrice
Vidal, Sébastien	Directeur de recherche CNRS Université de Lyon	Directeur de thèse
Leclaire, Julien	Professeur Université de Lyon	Co-directeur de thèse

Dédiée à Nicolas Dussart

Always look on the bright side of life
Monty Python

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Mme. Anne Imberty, Directrice de recherche CNRS, Mme. Anna Hirsch, Professeure, Mme. Claire Demesmay-Guilhin, Professeure, M. Matthieu Sollogoub, Professeur et M. Sébastien Ulrich, Chargé de recherche CNRS, qui ont accepté d'évaluer ces travaux.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Stéphane Chambert et Catherine Ladavière, membres de mon comité de suivi de thèse, pour leurs conseils et pour m'avoir aidé à orienter ma recherche.

Je tiens à remercier très chaleureusement mon co-directeur de thèse Julien Leclaire pour m'avoir fait confiance dès mes débuts en stage de M2 au sein du laboratoire CSAp il y a de cela 3 ans et demi. Merci pour m'avoir guidé à travers les méandres de la thèse toutes ces dernières années, pour m'avoir inculqué une rigueur scientifique, aidé à rédiger ce manuscrit et pour les bons moments (barbecue !) passés en ta compagnie et celle de l'équipe.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Sébastien Vidal. Il est difficile de résumer en quelques lignes 3 ans de gratitude... Tu as une empathie extraordinaire et tu m'as toujours soutenu que ce soit dans les moments difficiles ou dans la vie en règle générale (Direction Grenoooooble !). J'ai passé de super moments avec toi, au travail ou avec ta famille. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, sur le plan de la chimie mais surtout sur le plan humain. Je te souhaite de toujours rester comme ça avec tes étudiants !

Je souhaite aussi remercier tous les membres de mes deux (CSAp et LCO2) ainsi que les services communs de spectrométrie de masse (Alexandra, Christian, Antoine) et de RMN (Emmanuel) pour leurs disponibilités et pour m'avoir soutenu (supporté ?) durant ces trois ans. Merci pour les bons moments, les fous rires et les nombreux repas/bières. Je tiens aussi à citer les permanents d'autres équipes : Didier, Nuno, Estelle, Marie-Christine et Estelle

Ces trois années de thèse, ce furent trois années loin de la famille. Je n'ai pas pu être très présent mais je vous remercie du fond du cœur pour le soutien que vous m'avez accordé. Je tiens à mentionner particulièrement mes nouveaux « vieux » mariés de parents : Jean-Yves et Christine. C'est le plus beau cadeau de thèse que vous puissiez m'offrir. Merci de m'avoir soutenu ces trois ans comme vous l'avez fait depuis ma naissance. C'était dur mais ça en valait la peine.

Que serait une thèse sans les copains ?

C'est vous que je veux mettre en avant dans ces remerciements car je n'aurai jamais réussi sans vous. Que ce soit les amis de l'école d'ingé (Rookie, Bernard, Baloo, Gagathe, Bruschner, Tonio, Titilde, Robin, Ryry, Lauriiiiiiiie), les thésards (Le chauve, Albert, Charlounet, Totor, Chantal, Willy Wonka, MNOP, Maxtitz, Aubinou, Debrucq, Gribal, Yannou, DimDim, Lapin, Benji, Geoffy, Loulou, Chnono, Dédé, Nicole, Quenting, Laura & Lucie, Danny, Criton, Raphou, Vinh, Chérif, Yannick, Stéphane, Fanny), les amis d'enfance (Max & Guigui) ou les amis d'amis (Marinaaaaa, Johnny & Mariana, TP, Marion & Quentin, Marjiiiiie, Lily, Manooooon, Marianne), je vous remercie tous pour l'aide inestimable que vous m'avez apporté,

pour les nombreuses soirées (au bar ou ailleurs), pour m'avoir fait pleurer de rire et pour tous les bons moments passés.

Je n'ai hélas pas la place de vous remercier comme il se devrait, il faudrait écrire une deuxième thèse sur le sujet et j'ai la flemme !

Je mentionnerais particulièrement Papa Bernard pour le soutien qu'on a pu s'apporter durant ces 3 ans de galère, l'un à Grenoble, l'autre à Lyon. Pour les milliers de textos que nous avons dû échanger en 3 ans pour râler, se féliciter ou juste parler de nos vies. Je suis fier d'être bientôt un membre de ta famille (Olliiiiiiie) en tant que parrain !

De la même manière, je voudrais remercier Maman Rookie. C'est toujours un plaisir de te voir, j'ai hâte d'arriver à Grenoble pour pouvoir t'aider à supporter ta fin de thèse... Ou plutôt pour aller faire de l'escalade ensemble comme il se doit ! Je suis heureux à l'idée de pouvoir te voir plus souvent qu'une fois tous les deux mois comme ces trois dernières années !

Un grand merci à Manon, tu as été la plus belle rencontre que j'ai fait ces dernières années. C'est toujours un plaisir de parler avec toi sur des sujets que l'un ou l'autre ne maîtrise pas forcément. Ta curiosité et ta volonté de toujours t'interroger sur le monde qui t'entoure m'impressionnent toujours autant. Tu as été là dans les pires moments pour me remonter le moral et je t'en remercie du fond du cœur.

Je terminerai ces remerciements par la personne sans qui je n'aurai jamais réussi à achever cette thèse : Nico, cette thèse t'es dédiée. Tu vas sans doute te moquer de moi pour cela mais ce n'est pas bien grave car ça vient des tripes et je ne pouvais pas faire autrement. La première fois que je t'ai vu (la fausse), t'étais en survêt avec cette subliiiiime banane adidas et je me suis dit : « Tiens, voilà clairement un mec avec qui je m'entendrai pas ». A quel point ai-je eu tort de penser cela ?! J'ai découvert une personne aux qualités humaines exceptionnelles, toujours prêt à donner une seconde chance, un boute-en-train de génie et un compagnon de soirée extraordinaire. T'as été le pilier qui m'a permis de survivre à ma longue traversée du désert du milieu de thèse. Les soirs où on allait au bar tous les deux pour refaire le monde, les midis avec Charlounet et la Chantal, les soirées en tout genre... T'as été là dans les meilleurs et les pires moments de cette thèse. On a commencé ensemble dans un labo agonisant et on s'en est tiré ensemble ! Sans toi, j'aurai arrêté cette thèse depuis bien longtemps et c'est pour cela qu'elle t'es dédiée. Alors Nico, le chauve, Alex, Nicole... Je tiens à te dire Merci. Merci pour tout ce que tu m'as apporté durant ces 3 ans, pour m'avoir ouvert à la culture rap, m'avoir fait mourir de rire à de trop nombreuses reprises, m'avoir mis au sport et avoir partagé tant de délires avec moi. Tu as été le meilleur co-thésard / co-labo que j'eusse pu avoir et j'espère que notre amitié perdurera longtemps après cette thèse.

Abréviations

18C6	1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadécane
Ac	Acétyl
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
ATP	Adénosine triphosphate
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
CAN	Nitrate d'ammonium cérique
CCD	Chimie combinatoire dynamique
CCM/TLC	Chromatographie sur couche mince
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ConA	Concanavaline A
CRD	Domaine de reconnaissance des saccharides / Carbohydrate recognition domain
Cy	Cyclohexyl
CuAAC	Cycloaddition azoture-alcyne cuprocatalysée
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
dba	Dibenzylidèneacétone
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DFT	Théorie fonctionnelle de la densité
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMA	<i>N,N</i> -Diméthylacétamide
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dtbbpy	4,4'-Di- <i>tert</i> -butyl-2,2'-dipyridyl
DTT	DL-Dithiothréitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELLA	Enzyme-linked lectin assay
EP/PE	Ether de pétrole
EPS	Exopolysaccharide
ESI-MS	Ionisation par électronébuliseur – Analyse par spectrométrie de masse
FA	Acide formique
FDA	Food and drug administration
FimH	Type 1 fimbrial adhesin
FTICR-MS	Spectrométrie de masse à résonance cyclique ionique
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAT	Transporteur de l'acide γ -aminobutyrique
Gb ₃	Globotriaosylcéramide
Glyme	1,2-Diméthoxyéthane

GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférase
HCTU	Hexafluorophosphate de <i>O</i> -(1H-6-chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
hGST P1-1	Glutathion S-transférase humaine P1-1
HIA	Test d'inhibition de l'héماغglutination
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HP1	Protéine hétérochromatine 1
HPLC	Chromatographie en phase liquidé à haute performance
HPLS-MS	Chromatographie en phase liquidé à haute performance – Spectrométrie de masse
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ITC	Titration calorimétrique isotherme
Le ^a	Trisaccharide Lewis a
LecA	Lectine 1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LecB	Lectine 2 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LED	Diode électroluminescente
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
MALDI-ISD	Désorption-ionisation laser assistée par matrice – Décomposition dans la source
MALDI-TOF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice – Analyseur à temps de vol
<i>m</i> -CPBA	Acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
MIC	Concentration inhibitrice minimale
MS	Spectrométrie de Masse
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
PIDA	(Diacétoxyiodo)benzène
PIFA	[Bis(trifluoroacétoxy)iodo]benzène
ppm	Partie par million
Ppy	2-Phénylpyridine
RMN/NMR	Résonance magnétique nucléaire
SBDD	Conception de médicament basée sur la structure / Structure-based drug design
sjGST	Glutathion S-transférase de <i>Schistosoma japonicum</i>
SPR	Résonance des plasmons de surface
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBTU	Tétrafluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TEG	Triéthylèneglycol
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane

TIPS	Triisopropylsilane
Tf	Trifluorométhylsulfonyl
TMU	Tétraméthyl urée
tpm/rpm	Tour par minute
UV	Ultraviolet
Xantphos	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène

TABLE DES MATIERES

Introduction Générale	1
I. Introduction- Glycoscience et chimie combinatoire dynamique.....	3
I.1. Rappels sur l'infection bactérienne	5
I.1.1. Le rôle du biofilm	6
I.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
I.2.1. Présentation succincte	6
I.2.2. Les stratégies de lutte contre les infections de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
I.2.3. Viser l'adhésion cellulaire	9
I.2.4. Les lectines	9
I.2.4.1. LecA.....	9
I.2.4.2. LecB.....	11
I.2.5. La synthèse de ligands compétiteurs	12
I.2.6. Les ligands compétiteurs de LecA et LecB	13
I.2.6.1. Les ligands de LecA.....	13
I.2.6.2. Les ligands de LecB.....	19
I.3. La multivalence	23
I.3.1. Principe général	23
I.3.2. L'interaction monovalente.....	23
I.3.2.1. Les aspects cinétiques	23
I.3.2.2. Les aspects thermodynamiques.....	24
I.3.3. Les interactions multivalentes	24
I.3.4. La coopérativité	25
I.3.5. Le facteur d'amélioration β	25
I.3.6. Les différents types d'interactions multivalentes	26
I.3.6.1. L'effet chélate	27
I.3.6.2. L'effet statistique	28
I.3.6.3. Le regroupement de récepteur	28
I.3.6.4. Le site secondaire d'association.....	28
I.3.6.5. La stabilisation stérique	29
I.3.6.6. La réticulation	29
I.3.6.7. Le chélate agrégatif.....	29
I.4. La Chimie Combinatoire Dynamique	31
I.4.1. Introduction à la chimie combinatoire dynamique	31

I.4.1.1.	La chimie combinatoire	31
I.4.1.2.	La chimie combinatoire dynamique.....	32
I.4.2.	Les différents types de liaisons réversibles	34
I.4.2.1.	La liaison hydrogène.....	35
I.4.2.2.	La liaison de coordination.....	35
I.4.2.3.	Les liaisons covalentes réversibles	38
I.4.3.	Les équilibres dynamiques multiples.....	40
I.4.4.	La chimie combinatoire dynamique solide.....	42
I.4.5.	Limitations de la chimie combinatoire dynamique	43
I.4.5.1.	Non-compatibilité entre le stimulus et les conditions d'équilibration	44
I.4.5.2.	Difficultés d'identification des meilleurs ligands pour les grandes chimiothèques	46
I.4.5.3.	Amplification du meilleur ligand.....	47
I.4.5.4.	Isoénergicité des liaisons	50
I.4.5.5.	Vérifier l'atteinte de l'équilibre	51
I.4.6.	Les réactions réversibles compatibles avec les protéines	51
I.4.6.1.	Hydrazones/Acylhydrazones	52
I.4.6.2.	Les disulfures	57
I.4.6.3.	La chimie combinatoire dynamique avec des liaisons disulfures	59
I.5	Conclusion.....	62
II.	Synthèses de briques dithiolées glycosylées pour le criblage par chimie combinatoire dynamique.....	63
II.1.	Introduction	66
II.1.1.	Sélection des noyaux aromatiques.....	66
II.1.2.	Sélection des bras espaceurs	67
II.1.3.	Sélection des saccharides.....	68
II.2.	Etude bibliographique de la thiolation aromatique	68
II.2.1.	Le réarrangement de Newman-Kwart	68
II.2.1.1.	Le réarrangement Newman-Kwart activé thermiquement.....	68
II.2.1.2.	Le réarrangement de Newman-Kwart activé par oxydation	70
II.2.2.	Les couplages métallo-catalysés.....	72
II.2.2.1.	La catalyse au Nickel	72
II.2.2.2.	La catalyse au cuivre.....	73
II.2.2.3.	Le couplage à l'étain.....	74
II.2.2.4.	La catalyse au palladium.....	75
II.2.3.	Thiolation par lithiation	76

II.2.4.	La réaction de Grignard	76
II.2.5.	La substitution nucléophile aromatique	77
II.2.5.1.	Réaction de Pummerer	77
II.2.5.2.	Alternative à la réaction de Pummerer	78
II.3.	Synthèse de la brique acide 2,5-dimercaptotéréphtalique (A)	78
II.3.1.	Première voie de synthèse via le 2,5-dimercaptotéréphtalaldéhyde	79
II.3.1.1.	Couplage peptidique	79
II.3.1.2.	Déprotection du <i>S</i> -thiocarbamate	80
II.3.2.	Changement de groupement protecteur	81
II.3.3.	Deuxième voie de synthèse via l'acide 2,5-dimercaptotéréphtalique	82
II.3.3.1.	Introduction du groupement protecteur 2-cyanoéthyle	82
II.3.3.2.	Couplage peptidique	83
II.3.3.3.	Obtention des briques moléculaires dérivées de A	83
II.4.	Synthèse de la brique acide 2,5-dimercaptobenzoïque B	86
II.5.	Synthèse de la brique naphthalène diimide C	88
II.5.1.	Bromation du noyau naphthalène dianhydride	88
II.5.2.	Purification des composés (poly)bromés	89
II.5.3.	Voie Newman-Kwart	89
II.5.4.	Voie S _N Ar par un thiolate	90
II.5.4.1.	Optimisation de la réaction de S _N Ar	90
II.5.4.2.	Déprotection via réaction de Pummerer	91
II.5.4.3.	Exemplification de la réaction de S _N Ar	92
II.5.4.4.	Introduction du groupement protecteur cyanoéthyle via S _N Ar	93
II.5.4.5.	La saponification des esters	95
II.6.	Synthèse de la brique pyroméllitique D	97
II.6.1.	Synthèse de la brique diiodée	97
II.6.1.2.	Modification du bras espaceur	98
II.6.1.3.	Stabilité du diimide	98
II.6.2.	Introduction de la fonction thiolée	99
II.6.2.1.	Catalyse au cuivre	99
II.6.2.2.	Substitution nucléophile aromatique	99
II.6.3.	Synthèse du dérivé tétraester dibromé	101
II.7.	Synthèse des dérivés saccharidiques	102
II.7.1.	Rappels sur la glycosylation	102
II.7.2.	Synthèse des dérivés β-D-galactose et β-D-glucose	103

II.7.3. Synthèse du dérivé α -D-mannose	103
II.7.4 Synthèse du dérivé α -L-fucose	104
II.7.5. Formation parasite d'un composé <i>N</i> -acétyl	105
II.7.6. Synthèse alternative des dérivés saccharadiques aminés.....	105
II.8. Conclusion.....	106
III. Etude de briques dithiophénols glycosylées en chimie combinatoire dynamique.....	107
III.1. Introduction	110
III.1. Rappels bibliographiques.....	110
III.1.1. Concanavalline A	110
III.1.2. Oligomérisation des 1,4-dithiophénols en dyn[n]arènes	110
III.1.3. ConA en chimie combinatoire dynamique	114
III.2. Chimiothèques combinatoires dynamiques et optimisation des conditions réactionnelles	118
III.2.1. Préambule	118
III.2.2. Etude de l'oligomérisation d'une brique moléculaire seule	118
III.2.2.1. Choix de la solution tampon	118
III.2.2.2 La suroxydation et la cyclisation S-N.....	119
III.2.2.3. Suivi cinétique de la chimiothèque galactose F	120
III.2.2.4. Variation des conditions d'équilibration pour limiter la suroxydation	122
III.2.3. Chimie combinatoire dynamique en présence de ConA	123
III.2.3.1. Méthodologie de travail	123
III.2.3.2 Chimiothèque M :ConA	124
III.2.4. Chimiothèques combinatoires dynamiques mixtes	125
III.2.4.1. Chimiothèque M : A	126
III.2.4.2. Chimiothèque P	126
III.2.4.3. Chimiothèque M : F	127
III.2.4.4. Chimiothèque M : F :ConA	128
III.2.5. Modification de la cinétique d'équilibration	134
III.2.6. Etude du comportement des briques monovalentes	136
III.2.6.1. Chimiothèque Y_M	136
III.2.6.2. Chimiothèque Y_G	137
III.2.7. Chimiothèque mixte brique mono- et divalente : M : Y_M	138
III.3. Purification par HPLC semi-préparative.....	138
III.4. Titration calorimétrique isotherme.....	140
III.4.1. Présentation succincte de la titration calorimétrique isotherme	140

III.4.2. Mesure des paramètres thermodynamiques des dyn[n]arènes M ₃ et M ₄ pour ConA	140
III.4.3. Mesure des paramètres thermodynamiques des dyn[n]arènes G ₃ et G ₄ pour LecA	142
III.5. Conclusion.....	144
IV. Experimental section	147
IV.1. General information	147
IV.1.1. Reagents and solvents	147
IV.1.2. Nuclear Magnetic Resonance	147
IV.1.3. Mass Spectrometry.....	147
IV.1.4. High Performance Liquid Chromatography	147
IV.1.5. HPLC system	147
IV.1.6. HPLC-MS	149
IV.1.7. Melting point.....	149
IV.1.8. Lyophilization	149
IV.1.9. C18 Chromatography.....	149
IV.2. Synthesis	149
IV.2.1. General procedures	149
IV.2.2. Protocols	151
IV.3. Dynamic combinatorial libraries	202
IV.3.1. General procedures	202
IV.3.2. Protocols	203
IV.4. Semi-preparative high-performance liquid chromatography.....	207
IV.5. Isothermal titration calorimetry	207
V. Références bibliographiques	212
<i>Conclusion Générale</i>	224

Introduction Générale

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie multirésistante aux antibiotiques. C'est aussi la première cause de mortalité chez les personnes souffrant de la mucoviscidose. L'objectif de cette thèse est de trouver une voie alternative aux antibiotiques pour lutter contre ce pathogène. La stratégie choisie vise à empêcher l'adhésion cellulaire de la bactérie. Il est connu que le phénomène d'adhésion a lieu via deux lectines solubles LecA et LecB ayant une affinité pour le galactose et le fucose respectivement. Ces deux lectines sont des homotétramères en solution et des glycoclusters ont montré d'excellentes affinités pour ces dernières grâce à leur multivalence et au « Glycoside Cluster Effect ».

Au sein du laboratoire LCO2, des glycoclusters pillararènes, calixarènes, résorcinarènes, porphyrines, fullérènes, oligonucléotides ont déjà été synthétisés et ont montré de fortes affinités (nanomolaire) pour ces lectines. Un calix[4]arène 1,3-alterné a été identifié comme un des ligands les plus affins. Ses propriétés *in vitro* et *in vivo* ont été étudiées en collaboration avec un partenaire industriel et les tests menés sur la souris ont mis en évidence une réduction significative de l'infection pulmonaire causée par *Pseudomonas aeruginosa*.

Toutefois, ces résultats ne permettent pas de conclure si le calix[4]arène 1,3-alterné est le meilleur ligand pour les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour approfondir cette étude, une première méthode consisterait à synthétiser de multiples glycoclusters ayant des valences variées ce qui constitue une tâche fastidieuse et coûteuse. Une deuxième méthode vise à interroger directement les lectines afin d'obtenir des informations sur la valence et la structure de leurs meilleurs ligands en s'appuyant sur la chimie combinatoire dynamique.

La chimie combinatoire dynamique a été développée par les groupes de Lehn et Sanders à la fin des années 90. Leur idée a été de déplacer l'équilibre des réactions thermodynamiques via des moyens chimiques et notamment l'ajout d'une molécule cible (template). En partant de briques moléculaires possédant des groupements capables de former une liaison réversible, une distribution d'espèces est obtenue en fonction des stabilités thermodynamiques intrinsèques des oligomères formés. L'ajout d'un template va déplacer cet équilibre en amplifiant les oligomères ayant une affinité pour celui-ci. Grâce à la chimie combinatoire dynamique, il devient possible d'identifier les meilleurs ligands d'une molécule cible en une seule étape et parmi une bibliothèque de molécules en équilibre.

Le premier chapitre introduit le contexte de notre étude. En s'appuyant sur la littérature, nous définissons la structure des candidats-ligands des lectines de *Pseudomonas aeruginosa*. Nous introduisons aussi la multivalence et le « Glycoside Cluster Effect ». Enfin, nous explicitons le concept de chimie combinatoire dynamique et les modalités de son application aux protéines, notamment via le choix d'une liaison réversible dont les conditions d'échange sont biocompatibles.

Dans un second chapitre, les synthèses entreprises pour accéder à quatre briques moléculaires dithiolées et capables de s'auto-assembler seront présentées. Nous aborderons les diverses méthodes de thiolation aromatique existantes, étape clé de nos voies synthétiques. Nous verrons que plusieurs de ces synthèses ont donné accès à dix briques moléculaires mono- ou divalentes susceptibles d'oligomériser via la formation de ponts disulfures pour générer des glycodyn[n]arènes.

Dans le dernier chapitre, nous présenterons les études en chimie combinatoire dynamique des différentes briques moléculaires synthétisées via la formation des chimiothèques combinatoires dynamiques de glycodyn[n]arènes. Nous aborderons le cas de chimiothèques mixtes et nous analyserons les résultats obtenus en présence d'une lectine modèle, la concanavaline A. Nous verrons que certains glycodyn[n]arènes ont été identifiés comme des ligands très affins de cette protéine. Leur isolement par HPLC semi-préparative a permis de déterminer leur affinité via la mesure des paramètres thermodynamiques du phénomène de reconnaissance multivalent glycodyn[n]arène-lectine par ITC.

Chapitre 1

Introduction- Glycoscience et chimie combinatoire dynamique

I.1. RAPPELS SUR L'INFECTION BACTERIENNE

Les bactéries sont des organismes procaryotes, majoritairement unicellulaires. Bien que la plupart soient inoffensives pour l'Homme et même nécessaire à notre survie, certaines bactéries pathogènes telles *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* sont la source de graves infections pouvant être létales. Les bactéries peuvent évoluer selon deux modes de vie. Le premier, dit planctonique, correspond à la libre flottaison d'une bactérie dans un milieu donné. Le deuxième, qualifié de biofilm, se définit comme la formation d'une communauté de microorganismes adhérant à une surface. De nombreux rapports font état de la prédominance des biofilms dans les infections bactériennes avec des pourcentages variant entre 65 et 80%.¹ Depuis les années 80, la communauté scientifique s'est emparée du sujet et le mécanisme de leur formation a pu être identifié comme un processus en 5 étapes (Figure 1).²

La première consiste en l'attachement réversible de la bactérie planctonique à une surface pouvant être cellulaire ou inerte (organique ou inorganique) (Figure 1-I). Cette adhésion est facilitée par plusieurs facteurs tels l'hydrophobie de la surface de la bactérie, la présence d'un flagelle et/ou d'une fimbria.³ A ce stade, les bactéries sont encore motiles et se déplacent à la surface, notamment grâce à leurs pili, jusqu'à trouver un emplacement favorable à leur implantation.⁴

Après, les bactéries se fixent de manière irréversible à la surface grâce aux interactions de van der Waals entre celle-ci et la paroi externe de la bactérie. De plus, une production plus importante d'exopolysaccharides (EPS) permet d'ancrer la bactérie (Figure 1-II).

A la suite de cette fixation, des microcolonies correspondant à des regroupements de bactéries se forment (Figure 1-III). Lorsqu'une concentration critique en bactérie est atteinte, un phénomène de *quorum sensing* a lieu, poussant les bactéries à agir en tant que communauté et non plus en tant que somme d'individus. Une communication chimique s'établit entre les divers membres de la communauté, modifiant la régulation de certains gènes et donnant lieu à l'excrétion d'une matrice extracellulaire composée principalement d'EPS qui va venir encapsuler et protéger les bactéries du milieu extérieur et du système immunitaire de l'hôte.

Le biofilm passe alors par une phase de maturation durant laquelle les bactéries vont se multiplier et coloniser progressivement la surface (Figure 1-IV). La sécrétion de la matrice extracellulaire va s'amplifier et les bactéries vont s'enfouir plus profondément dans cette dernière. La plupart des biofilms vont alors prendre une structure particulière dite de « type champignon » où chaque microcolonie est séparée de ses congénères par des canaux aqueux permettant le passage des nutriments et du dioxygène.³

Enfin, le biofilm va se disperser, éjectant les bactéries emprisonnées qui retournent à un mode de vie planctonique, permettant ainsi la propagation de l'infection (Figure 1-V).

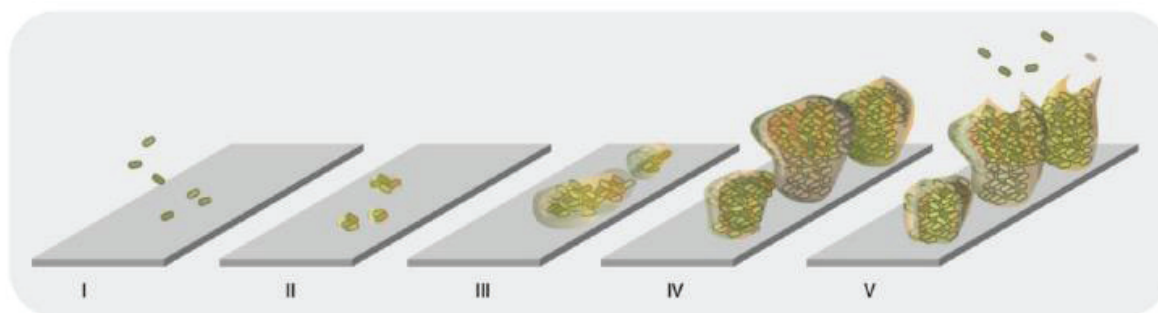


Figure 1 : Le développement de l'infection bactérienne²

I.1.1. Le rôle du biofilm

La formation de biofilm est un des mécanismes de défense des bactéries les plus redoutables. En effet, il a été observé que l'activité des antibiotiques était fortement réduite face aux biofilms. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène⁵ :

- Une diffusion ralentie ou incomplète des antibiotiques dans le biofilm, la matrice extracellulaire jouant le rôle de filtre physique entre le milieu extérieur et les bactéries.
- Une modification chimique de l'environnement local des bactéries via la formation de niche anaérobie qui pourrait affecter l'activité des antibiotiques.
- Une modification des phénotypes des bactéries lorsqu'elles sont sous forme de biofilm qui leur conférerait une meilleure résistance aux antibiotiques.

Un cas plus inquiétant impliquant un biofilm bactérien a été observé chez les patients souffrant de la mucoviscidose. Cette maladie, provoquée par une mutation du gène CFTR, provoque une déficience du transport d'ions chlorures au niveau des cellules épithéliales respiratoires entraînant une mauvaise clairance mucociliaire et favorisant ainsi les infections respiratoires. La compréhension des mécanismes sous-jacents à cette maladie a permis d'augmenter fortement l'espérance de vie des personnes affectées, passant de 8 à 40 ans.⁶ Néanmoins, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant l'éradication de la maladie. *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie colonisant le système respiratoire du patient sous forme de biofilm, a en outre été identifiée comme étant la cause principale de mortalité des personnes souffrant de la mucoviscidose.

I.2. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

I.2.1. Présentation succincte

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie de type Gram négatif découverte au 19^{ème} siècle par le chirurgien Charles Emmanuel Sédillot.⁷ Initialement identifiée comme agent infectieux, cette bactérie a depuis été retrouvée dans tous types d'environnements : marais, sol, plantes, tissus biologiques⁸ mais aussi à l'hôpital dans les savons, les éviers voire sur les appareils d'assistance respiratoire.⁷

Bien que cette bactérie soit inoffensive pour les personnes en bonne santé⁸ et même présente dans la flore intestinale chez l'adulte,⁹ une infection se déclarant chez des individus possédant

un système immunitaire affaibli peut mener à de graves dommages voire à la mort. Les cas les plus inquiétants sont ceux touchant les grands brûlés et les personnes souffrant de la mucoviscidose. Chez ces patients, le pathogène se manifeste tout d'abord par une infection virulente du système respiratoire. Puis, la bactérie va s'adapter et engendrer une infection chronique, affaiblissant progressivement le patient et le menant dans de nombreux cas à une mort prématurée.¹⁰

Sa présence en milieu hospitalier conjuguée à sa résistance intrinsèque fait de cette bactérie une des principales causes d'infections nosocomiales. Deux récentes études montrent sa prédominance parmi ces dernières. La première, publiée en 2009, estime entre 10 et 15% le pourcentage d'infections nosocomiales dues à *Pseudomonas aeruginosa* à travers le monde.¹¹ La seconde de 2013 et s'intéressant uniquement aux Etats-Unis, montre la présence de la bactérie dans 8 à 10% des infections nosocomiales identifiées.²

Pseudomonas aeruginosa est majoritairement isolée dans le système respiratoire mais également dans le sang, les brûlures et l'appareil urinaire.⁷ Sa propension à survivre dans des environnements hostiles et à s'adapter a mené ce pathogène à développer une multirésistance aux antibiotiques. En effet, si 20 ans en arrière des souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentaient une résistance à 3 ou 4 familles d'antibiotiques, des études plus récentes¹² attestent de la capacité de certaines souches à résister à plus de 10 familles d'antibiotiques. En outre, les cas de multirésistance les plus sévères sont observés dans les unités de soins intensifs où se situent les populations les plus susceptibles de contracter une infection.⁷

Un exemple frappant concerne l'étude conduite par le groupe de Singhala dans un hôpital indien.¹² Les auteurs ont montré que 23% des souches isolées du pathogène présentaient une résistance aux douze antibiotiques anti-*Pseudomonas* disponibles à l'hôpital.

Cette expansion du phénomène de multirésistance aux antibiotiques a été mise en évidence dans deux études statistiques conduites durant plusieurs années sur des patients en unité de soins intensifs (Figure 2). La première, effectuée aux Etats-Unis sur une période de 10 ans révèle que le nombre de bactéries résistantes à 3 antibiotiques ou plus a augmenté de 4 à 14%. La seconde donne des niveaux plus élevés avec une progression de 13 à 21% de ces bactéries en quatre ans seulement.

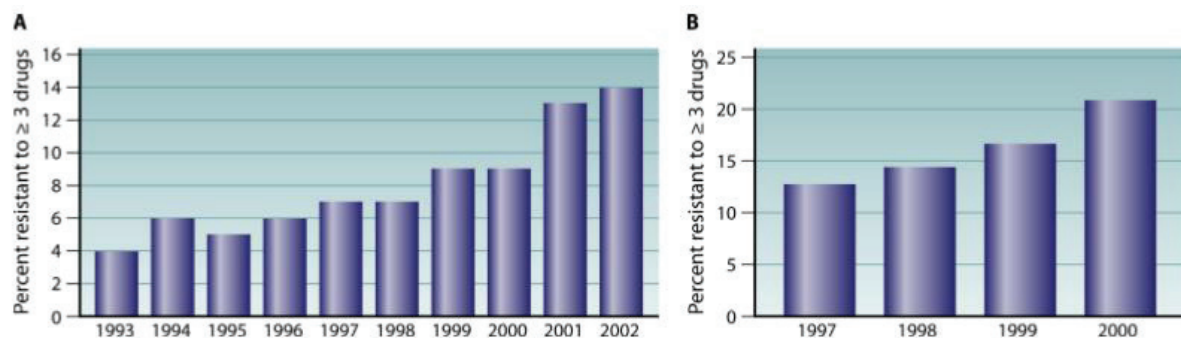


Figure 2: Evolution du phénomène de multirésistance de *Pseudomonas aeruginosa*.⁷ a) Données issues de 13 999 souches isolées collectées entre 1993 et 2002. b) Données issues de 37 390 souches isolées collectées entre 1997 et 2000.

La forte résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques peut s'expliquer par certaines prédispositions de la bactérie. En effet, la faible perméabilité de sa membrane externe,^{11,13} sa tendance à former un biofilm quasiment impénétrable et sa capacité à muter en cours de traitement en font un pathogène très difficile à éliminer.

Néanmoins, les sources majeures de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* durant les premiers stades de l'infection proviennent de ses mécanismes intrinsèques de défense, codés par son génome. Ainsi, la présence d'un gène inductible permettant la production d'ampicilline C cephalosporinase explique la résistance de la bactérie aux β -lactames.⁷ Une insuffisance de certains types de porine est également associée à une résistance partielle aux β -lactames, aminoglycosides, tétracyclines et fluoroquinolones. Enfin, la présence de nombreux transporteur membranaire connus sous le nom de pompes à efflux permet à la bactérie de rejeter dans le milieu extérieur les antibiotiques ayant réussi à pénétrer sa membrane externe.

La conjugaison de ces mécanismes de résistance, doublée de sa capacité à muter et à acquérir de nouvelles résistances en cours de traitement ont poussé le gouvernement américain à classer la bactérie à un niveau de dangerosité de 4 sur 5.¹⁴ Plus récemment, l'Organisation Mondiale de la Santé a placé comme priorité absolue la découverte d'antibiotiques actifs contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (Priorité 1 : critique).¹⁵

1.2.2. Les stratégies de lutte contre les infections de *Pseudomonas aeruginosa*.

A travers le monde, de nombreux groupes de recherche se sont intéressés aux moyens de lutter efficacement contre ce pathogène. De nombreuses stratégies de lutte visant les diverses phases de l'infection bactérienne ont ainsi été développées. Durant les deux dernières décennies, les synthèses de petites molécules organiques, de composés phytochimiques, de peptides antimicrobiens et de nanoparticules ainsi que le développement de thérapies à base d'anticorps ou d'enzyme, de bactériophage ou de molécule photosensible visant l'inhibition du biofilm et du *quorum sensing* ont vu leur essor.⁵ Le développement de nouveaux antibiotiques est aussi en cours pour trouver des réponses rapides à la multirésistance de la bactérie. Néanmoins, chacun de ces développements a des limitations intrinsèques. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* utilise diverses stratégies pour créer son biofilm et en cibler une seule ne permet pas forcément d'empêcher sa formation. Le *quorum sensing* est aussi une cible intéressante mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas totalement élucidés et ceux-ci divergent en fonction du stade de l'infection : aigüe ou chronique. Quant aux antibiotiques, ils sont déjà surnuméraires et, sur le long terme, la bactérie finira par s'adapter et développer une résistance à ces derniers. Une autre stratégie recevant de plus en plus d'intérêt de la part de la communauté scientifique a pour cible la toute première étape de l'infection bactérienne : l'adhésion cellulaire de la bactérie. Cette stratégie, préventive et non plus curative, à l'avantage de ralentir le développement de nouvelles résistances par la bactérie.¹⁶

I.2.3. Viser l'adhésion cellulaire

Le mécanisme d'adhésion cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas exactement connu. Toutefois, il a été montré que le flagelle, le pilus, la fimbria, l'ADN extracellulaire et les EPS ont une influence sur l'attachement de la bactérie.¹ En sus de ces différents éléments, deux protéines appartenant à la classe des lectines, LecA et LecB, ont attiré l'attention des scientifiques après la démonstration de leur implication dans l'adhésion cellulaire.^{17,18}

I.2.4. Les lectines

Les lectines sont une classe de protéine capable de reconnaître les saccharides. En 1954, Boyd et Shapleigh observent la capacité des agglutinines issues de plantes à sélectionner parmi différents érythrocytes de groupes sanguins différents. Ils décident de leur donner le terme générique de lectine, provenant du latin *legere* signifiant choisir. En 1972, Sharon et Lis élargissent ce terme à toutes les agglutinines spécifiques des saccharides et d'origine non immunitaire.¹⁹

Les lectines sont impliquées dans de multiples phénomènes biologiques. Chez les plantes, leur participation à la fixation de l'azote ainsi que leur utilisation comme mécanisme de défense contre divers parasites et champignons ont été démontrés. Chez les agents infectieux, leur implication a pu être observée dans l'adhésion cellulaire et la formation de biofilm. D'autres études les classent parmi les facteurs de virulence des bactéries pathogènes. Leurs affinités pour les saccharides étant faibles, classiquement millimolaire, la multiplication des interactions est nécessaire pour expliquer leurs grandes spécificités.^{20,21}

LecA et LecB font toutes les deux parties de la sous-famille des lectines de type C. Ces dernières sont caractérisées par la présence d'au moins un ion calcium dans le domaine de reconnaissance des saccharides (CRD), cet ion Ca^{2+} étant impliqué dans la stabilité du CRD et dans l'interaction avec le saccharide. Elles sont produites comme des protéines transmembranaires ou solubles et sont généralement impliquées dans l'adhésion cellulaire.²² Bien qu'étant sécrétée de manière intracellulaire, les deux lectines ont été observées au niveau de la membrane cytoplasmique, de l'espace périplasmique et de la membrane externe.²³ Plusieurs théories existent pour expliquer la présence de ces lectines sur la paroi externe. La plus communément admise implique que lors de la lyse d'une bactérie, les lectines soient expulsées dans le milieu extracellulaire où elles pourront se fixer à des oligosaccharides présents à la surface d'autres bactéries à proximité.

I.2.4.1. LecA

LecA a été découverte par le groupe de Gilboa-Garber en 1972. Son séquençage 20 ans plus tard par le même groupe a permis la détermination des 121 acides aminés constituant la lectine et lui donnant une masse moléculaire de 12.75 kDa. Divers tests d'affinité ont permis d'identifier les α et β -galactosides comme les meilleurs ligands de LecA²³ et le trisaccharide globotriaosylcéramide (Gb_3) est supposé être le ligand naturel de la lectine (Figure 3). La première structure cristallographique de la protéine, en présence d'un ion calcium, a été obtenue

par le groupe de Wang en 2003.²⁴ La même année, Imberty, Gilboa-Garber *et coll* élucidaient la structure cristalline en présence de galactose et de calcium (Figure 4a).²⁵ Cette dernière analyse a révélé la structure homotétramérique de la lectine. Chaque unité monomérique ne présentait qu'un seul CRD et la présence dans chaque site de liaison d'un ion calcium a pu être observée. Grâce à cette analyse structurale, l'influence de l'ion calcium dans la stabilisation de l'interaction avec le saccharide a pu être déterminée. Ainsi, les atomes O3 et O4 du galactose sont impliqués dans la sphère de coordination de l'ion Ca^{2+} . La spécificité de la lectine est liée à la relation *cis* entre ces deux atomes d'oxygène, ce qui explique la non-activité du glucose. De plus, six liaisons hydrogènes entre la protéine et les hydroxyles du saccharide ainsi qu'un pont avec une molécule d'eau sont observés.²³

L'élucidation de la structure homotétramérique a permis d'établir l'espacement entre les différents sites de liaison. La forme parallélépipédique du complexe donne une distance minimum de 29 Å dans la largeur ce qui est une distance raisonnable pour espérer qu'un glyocluster optimisé puisse simultanément lier les deux sites de liaisons (Figure 4b).

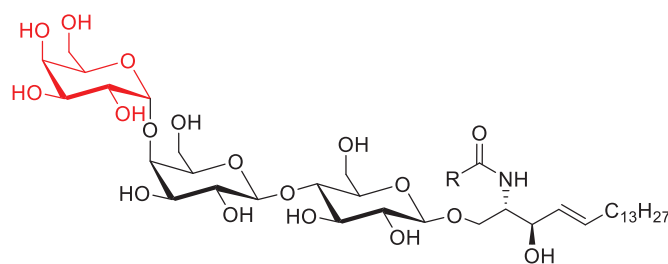


Figure 3 : Structure du trisaccharide Gb₃, ligand naturel de LecA. En rouge : galactose reconnu par la lectine

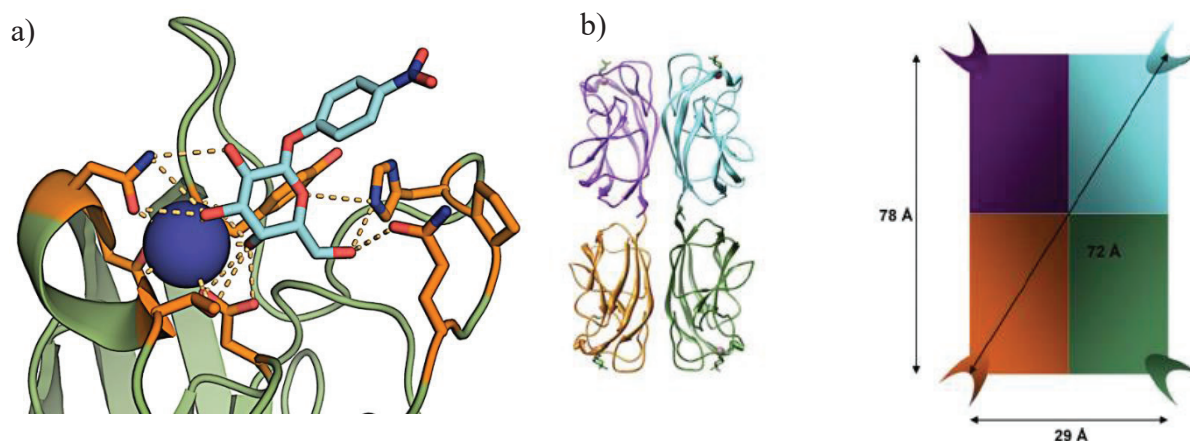


Figure 4 : a) Site actif de LecA en présence de galactose.²¹ b) Forme géométrique de LecA et distance entre les sites de liaison.²⁶

Récemment, un nouveau site possédant une affinité faible pour le glucose (non détectée en ITC) a été identifié par le groupe d'Imberty.²⁷ Ce dernier, situé à côté du site de liaison du galactose peut s'avérer intéressant pour la synthèse d'hétéroglyoclusters.

I.2.4.2. LecB

LecB a aussi été découverte par le groupe de Gilboa-Garber. Sa séquence, élucidée en 2000, établit l'enchaînement de 114 acides aminés pour une masse moléculaire de 11.73 kDa.²⁸

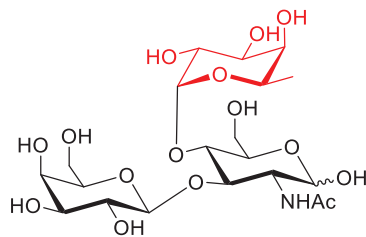


Figure 5 : Structure du trisaccharide Le^a, ligand naturel de LecB. En rouge : fucose reconnu par la lectine.

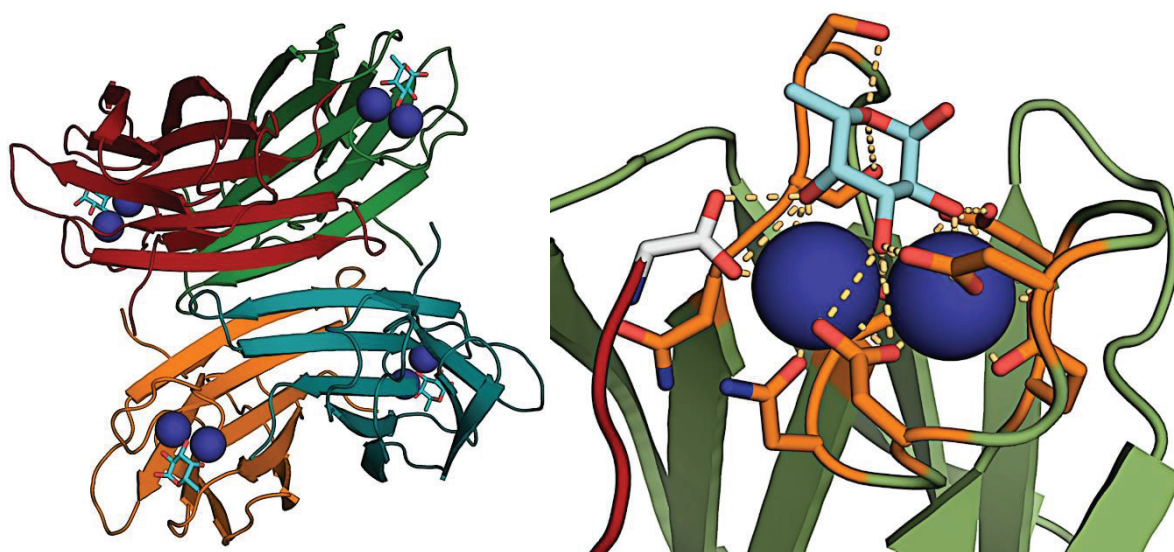


Figure 6 : LecB et site de liaison de LecB en présence d'ions calcium (en bleu) et d'une molécule de α-L-fucose.²¹

Initialement isolée via une colonne chromatographique de D-mannose, les L-fucosides ont été identifiés comme les meilleurs ligands de LecB. Sa très forte affinité pour le Le^a ($K_d = 220$ nM en ITC) suggère que ce soit son ligand naturel *in vivo* (Figure 5).²⁹

Similairement à LecA, la lectine se présente sous la forme d'un homotétramère avec un seul site de liaison par unité monomérique. Des analyses structurales ont révélé la présence de deux ions calcium dans chaque site de liaison. Ainsi, en présence de L-fucose il a été observé que O2 était lié à un premier ion calcium, O4 au deuxième et O3 aux deux simultanément. Sept liaisons hydrogènes sont aussi observées entre les différents groupements hydroxyles et la protéine. Enfin, le méthyle se loge dans une cavité hydrophobe du site de liaison (Figure 6).

Contrairement à LecA, il apparaît difficile de lier deux sites de liaison de la lectine via un glycocluster. En effet, la conformation de la protéine ainsi que l'agencement tétraédrique entre les divers sites de liaison ne se prête que peu à un effet de type chélate.

Les études sur la toxicité de LecB ont établi la capacité de la lectine à bloquer le battement des cils vibratiles, empêchant ainsi l'expulsion des bactéries par l'organisme et permettant la mise en place du biofilm.²³

I.2.5. La synthèse de ligands compétiteurs

Pour considérer la synthèse de ligands pour ces deux lectines, il est nécessaire de définir le cahier des charges auquel doivent répondre ces derniers. Avant toute chose, aucune interaction covalente n'existe dans le complexe lectine-saccharide à l'état naturel. Un seul exemple synthétique a été publié par le groupe d'Alexander Titz impliquant une liaison covalente entre la Cys62 de LecA et un ligand possédant une fonction époxyde en position C6 d'un dérivé du galactose.³⁰ Bien qu'observé en MALDI-MS, aucune méthode n'a permis à ce jour de co-cristalliser l'adduit formé. Seule une cristallisation à pH 4.6 avec l'époxyde toujours présent a été obtenue (Figure 7).

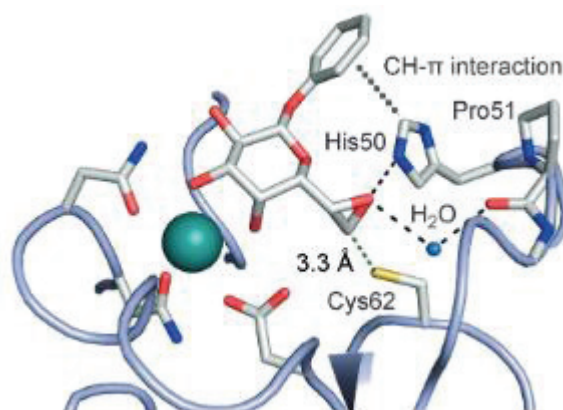


Figure 7 : Interaction entre la Cys62 et un ligand galactosylé portant une fonction époxyde en C6

Ainsi, les interactions permettant la reconnaissance saccharide-lectine à considérer sont :

- Les forces de van der Waals (Debye, London, Keesom) < 5kJ/mol
- L'effet hydrophobe 1-3 kJ/mol
- Les interactions π (π -cation, π -anion, π -stacking) 1-5 kJ/mol
- La liaison hydrogène 1-50 kJ/mol
- La liaison ionique 5-20 kJ/mol

Du fait de la faible énergie de liaison de ces interactions³¹, l'affinité lectine-saccharide est en général faible, les constantes de dissociation allant du millimolaire à la centaine de micromolaire. La constante de dissociation de LecA avec le D-galactose est par exemple de 2.9×10^{-5} M. Bien que LecA possède une plus forte affinité pour les α -galactosides, la majorité des ligands existant dans la littérature sont des β -galactosides due à leur plus grande simplicité de synthèse.³² LecB est une lectine remarquable pour sa très forte affinité avec divers saccharides et notamment le fucose. Originellement mesurée à 6.7×10^{-7} M via un test HIA,³³ sa constante de dissociation a été réévalué dans l'intervalle 2.9×10^{-6} M < K_d < 5.5×10^{-6} M suite à l'apparition de l'ITC. L'explication d'une si forte affinité a été attribuée à la présence des deux atomes de calcium et d'une molécule d'eau dans le CRD.³²

Un autre phénomène à prendre en compte est la présentation des ligands à la lectine. Le caractère multivalent de ces dernières favorise un potentiel « Glycoside Cluster Effect » (Cf Chapitre 1, I.3.1) et l'orientation des épitopes face à la lectine est un paramètre primordial à prendre en compte.

I.2.6. Les ligands compétiteurs de LecA et LecB

Actuellement, de nombreux groupes travaillent sur la synthèse et l'optimisation de ligands des deux lectines. La prochaine partie ne se veut pas exhaustive de ces résultats mais veut mettre en valeur les meilleurs ligands existant ainsi que l'optimisation derrière leur grande affinité.

I.2.6.1. Les ligands de LecA

LecA est sans aucun doute la lectine la plus étudiée de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, il a rapidement été démontré qu'un effet chélate entre deux sites actifs de la lectine pouvait amplifier l'affinité de manière substantielle.^{34,35} De plus, la faible affinité de base de la lectine pour le galactose rend ces résultats encore plus impressionnants (Tableau 1).

Le groupe de Roland J. Pieters a développé une stratégie portant sur l'optimisation du bras espaceur entre deux épitopes. Après des études préliminaires, ils ont montré que le passage d'un ligand monovalent à un ligand divalent augmentait fortement l'affinité avec un passage du millimolaire au nanomolaire (Entrée 4).³⁶ Attribuant cela à un effet chélate, la nature du bras espaceur reliant les deux galactoses a été modifiée pour optimiser l'affinité (Entrée 5). De leurs travaux, plusieurs conclusions ont pu être tirées :

- Le bras espaceur ne doit pas excéder une certaine longueur, la pénalité entropique devenant trop importante et entraînant une décroissance de l'affinité.
- Une rigidification du bras espaceur via l'incorporation d'un enchainement de monomère glucose et triazole augmente fortement l'affinité (gain entropique).
- Il est nécessaire de laisser une certaine flexibilité au niveau de l'aglycone pour l'insertion du galactose dans le CRD.

Ces travaux ont été couronnés de succès et leur ligand divalent (Entrée 5) reste à ce jour le meilleur ligand de LecA avec un K_d de 28 nM mesuré en ITC.³⁷

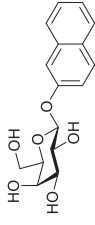
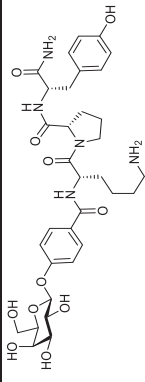
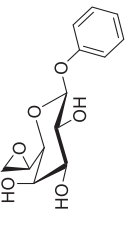
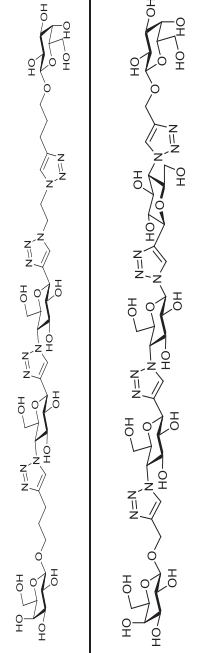
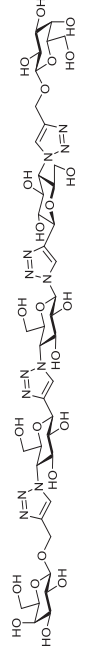
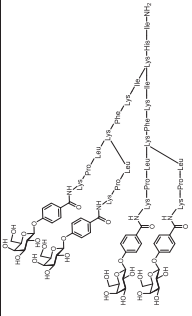
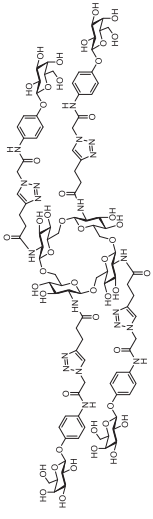
Le groupe de René Roy s'est pour sa part intéressé à la synthèse de dendrimères de valence comprise entre 6 et 27.^{38,39} La première génération de dendrimère était basée sur la formation de triazole via une cycloaddition de Huisgens. Une augmentation drastique de l'affinité a été observée pour des valences de 9 (Entrée 14) avec une multiplication par 400 de l'affinité par rapport au β galOMe, accédant ainsi au nanomolaire. Toutefois, les composés ayant les plus hautes valences se sont révélés peu solubles et aucunes données thermodynamiques n'ont pu être obtenues.³⁸ Une nouvelle famille de dendrimères a été synthétisée en utilisant cette fois-ci des glucoses porteurs de groupement *O*-allyl. Des dérivés galactosylés possédant un aglycone portant en bout de chaîne un thiol étaient alors greffés via une réaction de type thiol-ène.³⁹ La solubilité de ces nouveaux composés s'avéra suffisante pour déterminer l'affinité d'un dendrimère de valence 24 (Entrée 16). Celle-ci fut mesurée en SPR à 230 nM. Ce résultat correspond à celui obtenu en ITC pour le dendrimère de valence 9 (Entrée 14). Il semble ainsi que l'augmentation de la valence au-delà d'un certain seuil n'entraîne pas une augmentation significative de l'affinité.

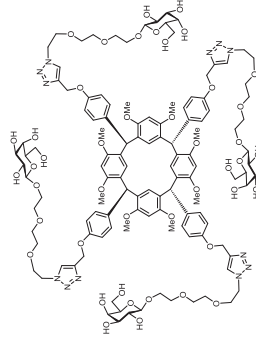
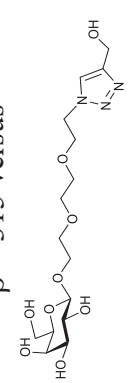
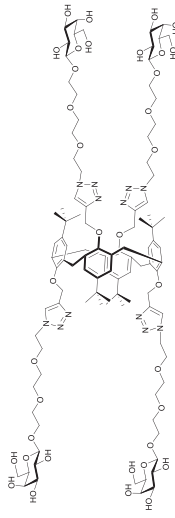
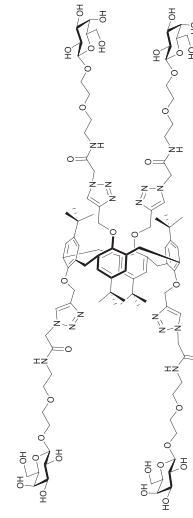
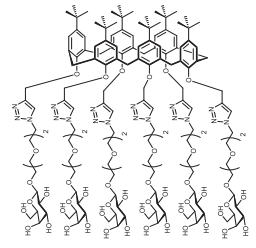
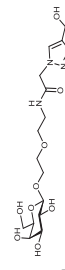
Le groupe de Jean-Louis Reymond a été un des plus prolifiques. Leurs recherches se sont concentrées sur des dendrimères glycopeptidiques de valences 2 et 4 (Entrée 6).⁴⁰⁻⁴² Dans un premier temps, ils ont montré que la présence d'un aglycone aromatique était favorable à l'interaction lectine-saccharide (Entrée 1). En effet, la présence d'une histidine en position 50 crée une interaction CH- π « T-shape » avec l'aglycone aromatique, permettant une augmentation de l'affinité par un facteur 20.⁴¹ Un squelette carboné peptidique a alors été envisagé (Entrée 2) et l'affinité des molécules monovalentes ainsi formées n'est pas altérée.⁴⁰ Divers dendrimères glycopeptidiques de valence 4 ont été synthétisés et l'un d'entre eux s'est révélé particulièrement actif avec une affinité de l'ordre de la centaine de nanomolaire (Entrée 6).⁴² Enfin, ces dendrimères sont les premières espèces capables de disperser le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

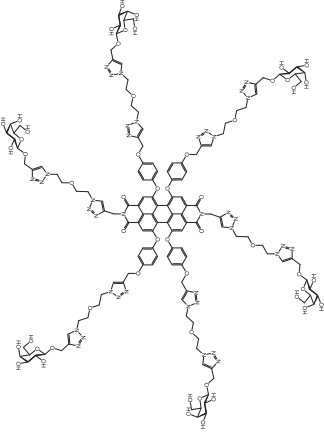
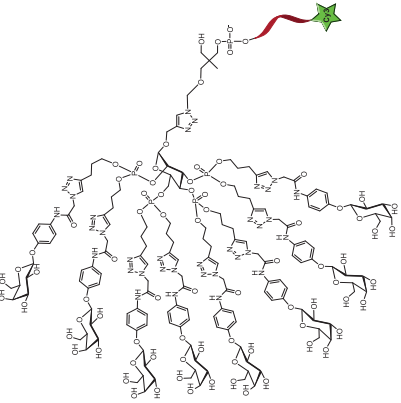
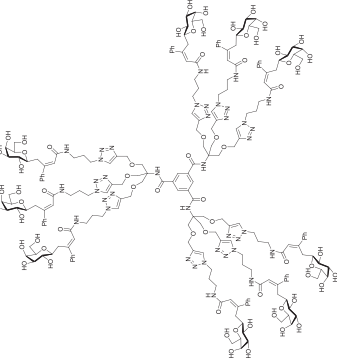
Le groupe de Sébastien Vidal s'est penché sur la présentation des saccharides à la lectine. Pour cela, de nombreux glycoclusters ayant un cœur différent ont été synthétisés : glycoside (Entrée 7),⁴³ résorcinarène (Entrée 8),⁴⁴ calixarène (Entrées 9-11),^{34,35,45} pérylènediimide (Entrée 12),⁴⁶ oligonucléotide (Entrée 13),^{47,48} pillararène (Entrée 15),^{49,50} et fullerène (Entrée 16).^{51,52} Tous ces glycoclusters ont des affinités de forte à excellente, pour la plupart de l'ordre de la centaine de nanomolaire. Toutefois, rapporté au nombre de saccharide, le calix[4]arène 1,3-alterné (Entrée 9) est le plus prometteur. En effet, sa synthèse est une des plus simples parmi les squelettes carbonés investigués. De plus, des études précliniques sur son activité et sa toxicité ont été menées avec un partenaire industriel, démontrant sa viabilité en tant que potentiel médicament. Son efficacité préventive pour les cas d'infection pulmonaire a été prouvée sur la souris.

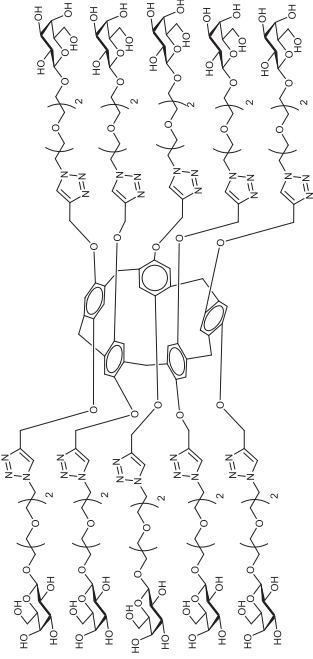
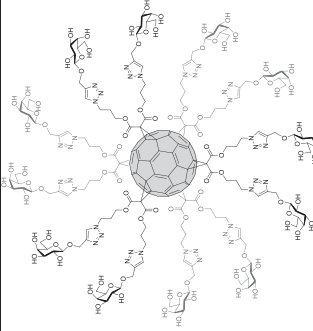
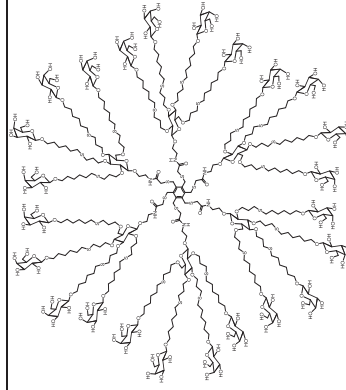
Très récemment, le groupe d'Alexander Titz a développé le premier ligand covalent de LecA (Entrée 3).³⁰ L'ouverture de l'époxyde par une cystéine présente dans le site de liaison de la lectine permet la formation de la liaison covalente. Son IC₅₀ a été mesuré à 64 μ M ce qui reste loin des meilleurs ligands multivalents de LecA mais en fait le meilleur ligand monovalent. De plus, la molécule a été couplée à une fluorescéine et des études en présence du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisées. De ces diverses expérimentations, il ressort qu'il est possible d'observer directement le biofilm de la bactérie.

Tableau 1 : Ligand mono- et multivalents de LecA ainsi que leurs études d’affinité

Entrée	Structure	Valence	Etude d’affinité	
1		1	HIA MIC = 700 μ M β = 25 versus Gal	ITC K_d = 4.2 μ M β = 21 versus Gal
2		1	HIA MIC = 312 μ M	ITC K_d = 2.7 μ M β = 33 versus Gal
3		1	IC ₅₀ = 64 μ M	
4		2	ELLA IC ₅₀ = 220 nM β = 545 versus β GalO(CH ₂) ₃ C $\equiv$ CH	
5		2	ELLA IC ₅₀ = 2.7 nM β = 7555 versus β GalO(CH ₂) ₃ C $\equiv$ CH	ITC K_d = 28 nM
6		4	HIA MIC = 0.78 μ M β = 4 000 versus Gal	ITC K_d = 100 nM β = 875 versus Gal
7		4	HIA MIC = 1.2 μ M β = 5122 versus β GalOMe	ELLA IC ₅₀ = 57 nM β = 50 versus β GalOMe ITC K_d = 79 nM β = 886 versus β GalOMe

8		4	ELLA IC ₅₀ = 0.7 μM β = 315 versus 		
9		4	HIA MIC = 500 μM β = 20	SPR IC ₅₀ = 0.5 μM β = 144	ITC K _d = 176 nM β = 852
10		4	HIA MIC = 500 μM β = 20	ELLA IC ₅₀ = 7 μM β = 50	SPR IC ₅₀ = 1 μM β = 58
11		6	HIA MIC = 63 μM β = 159	SPR IC ₅₀ = 0.8 μM β = 80	ITC K _d = 140 nM β = 1071
			versus 		
			versus 		
			versus 		

12		6	ITC $K_d = 143 \text{ nM}$ $\beta = 489$ versus βGalOMe
13		8	Microarray reverse ELLA $\text{IC}_{50} = 6.8 \text{ mM}$ $\beta = 1361$ versus monogalactosylated reference
14		9	ITC $K_d = 230 \text{ nM}$ $\beta = 409$ versus βGalOMe

15		10	HIA MIC = 5 μ M β = 1250 versus β GalOMe	ELLA IC ₅₀ = 218 μ M β = 3 versus β GalOMe	SPR IC ₅₀ = 366 nM β = 191 versus β GalOMe	ITC K_d = 47 nM
16		12	HIA MIC = 0.78 μ M β = 6410 versus β GalOMe	ELLA IC ₅₀ = 40 nM β = 4325 versus β GalOMe	SPR IC ₅₀ = 367 nM	
17		24	SPR K_d = 230 nM			

I.2.6.2. Les ligands de LecB

LecB a aussi été intensivement étudiée. Nonobstant sa faible spécificité, un consensus s'est rapidement formé pour l'étude de ligand portant un L-fucose comme épitope (Tableau 2). Les travaux du groupe de René Roy ont été pionniers en la matière.^{53,54} Pour rester proche de la structure du Le^a, des dérivés de type α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcNAc ont été synthétisés. Dans un premier temps, leur étude s'est portée sur une série de ligands monovalents.⁵⁴ De ces travaux il est apparu que l'aglycone du β -D-GlcNAc n'a pas d'influence sur l'affinité et que l'enchaînement α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcNAc est suffisant pour la reconnaissance par la lectine. Un des meilleurs ligands possédant un K_d de 310 nM se révéla être le composé portant un aglycone de type triazole avec un hydroxyméthyl en position 4 (Entrée 18). À la suite de ces premiers résultats, l'étude s'est orientée vers des glycoclusters divalents et trivalents (Entrée 21).⁵³ Le gain en affinité reste faible (multiplié par 3) ce qui laisse supposer un effet de réticulation mais pas d'effet chélate.

Adaptant ses travaux sur LecA, le groupe de Jean-Louis Reymond a synthétisé divers dendrimères glycopeptidiques ayant une valence comprise entre 2 et 8 (Entrées 25-28).⁵⁵⁻⁵⁸ Une augmentation de la valence de 4 à 8 (Entrée 28) a permis d'augmenter l'affinité d'un ordre de grandeur. Toutefois, la variation de l'aglycone pour un aromatique (Entrée 27) n'a pas mis en évidence une modification de l'affinité.⁵⁶

Le ligand possédant la plus haute valence a été synthétisé par le groupe de Renaudet. Fondé sur un motif cyclodécapeptide, ce ligand possède 16 épitopes de L-fucose (Entrée 30). L'affinité mesurée en ITC dans le domaine du picomolaire en fait le meilleur ligand multivalent de LecB synthétisé à ce jour.⁵⁹

Le groupe d'Alexander Titz s'est concentré sur la synthèse de glycomimétiques. Leur étude a tout d'abord porté sur des ligands oligosaccharidiques mono ou bivalents.⁶⁰ L'un d'entre eux (Entrée 22) s'est révélé particulièrement affiné avec un IC_{50} de 114 nM. Bien qu'aucune preuve structurale n'ait été apportée, des études de docking moléculaire ont mis en évidence la possibilité pour les deux épitopes de se fixer dans deux sites de liaison de la même lectine (Figure 8) faisant ainsi de ce ligand bivalent le premier pouvant avoir un effet chélate avec LecB. Le groupe s'est ensuite penché sur l'optimisation de ligand monovalent. Deux molécules C-glycosylées (Entrées 19-20) et possédant des groupements sulfonamides en β du carbone anomère ont manifesté des affinités de l'ordre du micromolaire.⁶¹ Un brevet a été déposé pour protéger ces structures.⁶²

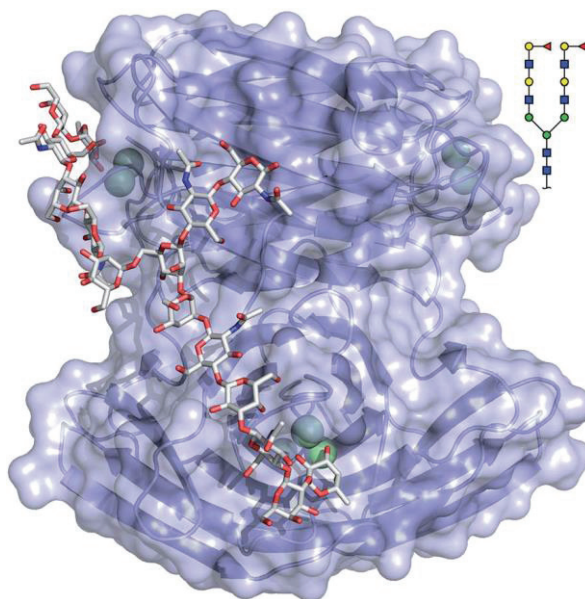
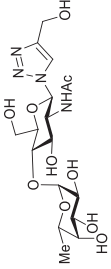
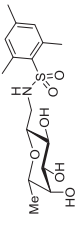
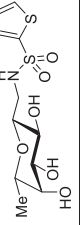
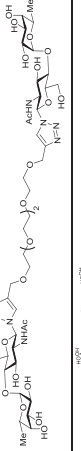
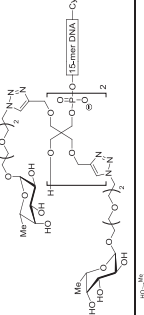
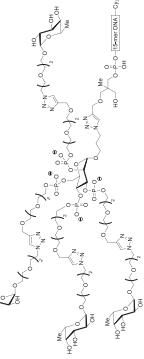
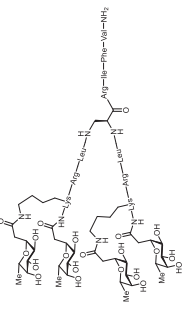
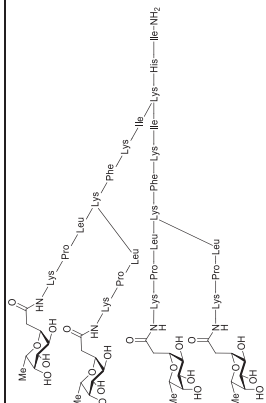
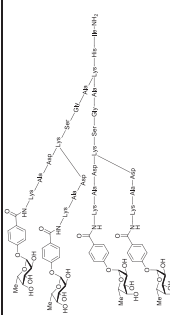
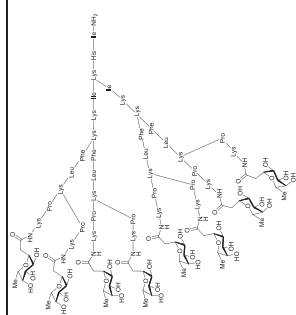
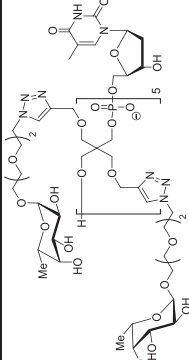
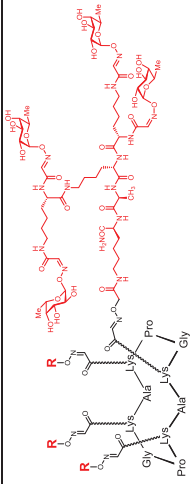


Figure 8 : Modélisation moléculaire d'un ligand bivalent de LecB⁶⁰

Associée au groupe de Vidal, l'équipe de Morvan s'est intéressée au nombre et à la présentation des épitopes à la lectine. Divers oligomères de pentaérythrityl phosphodiester fucosylés possédant des valences de 2 à 10 ont été synthétisés (Entrées 23, 29).^{63,64} Les études d'affinité montrent une augmentation de l'affinité avec la valence mais un plateau est rapidement atteint lorsque la valence dépasse 4.⁶³ La présentation des épitopes a été étudiée via différentes architectures reposant sur un saccharide central.⁶⁴ A nombre d'épitopes équivalent, une unité mannose centrale (Entrée 24) donne la meilleure amplification avec une constante de dissociation de 14 μM en ELLA.

Tableau 2: Ligand mono- et multivalent de LecB ainsi que leurs études d'affinité

Entrée	Structure	Valence	Etude d'affinité	
18		1	ELLA IC ₅₀ = 0.57 μM	ITC K _d = 0.31 μM β = 9 versus Fuc
19		1	ITC K _d = 1.3 μM	ELLA IC ₅₀ = 0.97 μM
20		1	ITC K _d = 0.8 μM	ELLA IC ₅₀ = 1.8 μM
21		2	ITC K _d = 90 nM	
22		2	ELLA IC ₅₀ = 0.11 μM β = 8 vs monovalent ligand	
23		4	Microarray reverse ELLA IC ₅₀ = 15 μM β = 75 versus Fuc	
24		4	Microarray reverse ELLA IC ₅₀ = 14 μM β = 70 versus Fuc	
25		4	ELLA IC ₅₀ = 0.59 μM β = 29 versus Fuc	

26		4	ELLA IC ₅₀ = 0.14 μM β = 79 versus Fuc	
27		4	ELLA IC ₅₀ = 0.11 μM β = 100 versus Fuc	
28		8	ELLA IC ₅₀ = 25 nM β = 440 versus Fuc	
29		10	ELLA IC ₅₀ = 0.25 μM β = 22 versus Fuc	
30		16	ELLA IC ₅₀ = 0.6 nM β = 1033 versus αFucOMe	ITC K _d = 28 nM β = 15 versus αFucOMe

I.3. LA MULTIVALENCE

I.3.1. Principe général

Pour rationaliser les fortes amplifications observées avec les divers glycoclusters présentés, il est nécessaire d'envisager un effet multivalent au niveau de l'interaction lectine-ligand. La valence d'une molécule se caractérise par le nombre de connexion unique du même type qu'elle est capable de former avec d'autres molécules selon un système ligand-récepteur.⁶⁵ Lorsque ce nombre de connexion est supérieur à 1, la molécule est dite multivalente, ce qui définit ainsi le terme « multivalence ». L'effet multivalent se définit quant à lui comme la combinaison de plusieurs associations simultanées entre deux partenaires ayant pour conséquence observable que la constante totale d'association soit supérieure au produit de n fois la constante d'association de chacun des événements pris indépendamment corrigé par un facteur d'amélioration β (eq 1).

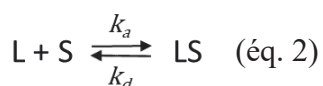
$$K^{\text{mul}} = \beta(K^{\text{mono}})^n \text{ (eq. 1)}$$

À la suite de l'observation de ce phénomène dans les interactions lectines-saccharides, Lee *et al* proposèrent de le nommer « Glycoside Cluster Effect ».⁶⁶

I.3.2. L'interaction monovalente

Pour définir une interaction multivalente, il est nécessaire d'appréhender les composantes cinétiques et thermodynamiques régissant l'interaction monovalente.

I.3.2.1. Les aspects cinétiques



En considérant une interaction monovalente entre une lectine (L) et un saccharide (S) permettant la formation d'un complexe (LS) (eq. 2), il est possible de déduire l'équation cinétique suivante :

$$v_a = k_a[L][S] ; v_d = k_d[LS] \text{ (eq. 3)}$$

La variable v_a représente la vitesse d'association entre les deux partenaires tandis que v_d correspond à celle de dissociation du complexe formé. Lorsque l'équilibre de la réaction est atteint, la formation et la dissociation du complexe se font à la même vitesse d'où $v_a = v_d$.

Via l'équation entre les constantes d'association (K_a) et de dissociation (K_d) à l'équilibre (eq. 4) et en appliquant la loi de Van't Hoff, il est possible de lier les paramètres cinétiques aux paramètres thermodynamiques (eq. 5)

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[L][S]}{[LS]} = \frac{1}{K_d} \quad (\text{éq. 4})$$

$$\Delta G^{mono} = -RT \ln K_a^{mono} = \Delta H^{mono} - T \Delta S^{mono} \quad (\text{éq. 5})$$

I.3.2.2. Les aspects thermodynamiques

D'après l'équation 5, il est possible de relier la constante d'association à l'équilibre à l'enthalpie (H) et l'entropie (S) du système. (éq. 6).

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H^{mono}}{RT} + \frac{\Delta S^{mono}}{R} \quad (\text{éq. 6})$$

La variation d'enthalpie ΔH correspond à la différence d'enthalpie entre l'état de départ et l'état d'équilibre de chacun des composants du système étudié. De la même manière, la variation d'entropie ΔS correspond à la différence d'entropie entre l'état de départ et l'état d'équilibre de chacun des composants du système étudié.

I.3.3. Les interactions multivalentes

Le passage d'une interaction monovalente à des interactions multivalentes entre un ligand et un récepteur multivalent complexifie grandement le système étudié et de nombreuses approximations doivent être faites pour le décrire. Nous nous restreindrons dans cette partie aux travaux de Whitesides *et coll.*⁶⁵ Le postulat des auteurs repose sur une interaction multivalente de type chélate et ne prend pas en compte tout autre type d'interaction. De plus, plusieurs hypothèses sont émises pour développer leur théorie :

- Les sites de liaisons d'un récepteur multivalent sont indépendants les uns des autres.
- Les sites de liaisons ont les mêmes caractéristiques d'association.
- Les différentes interactions multivalentes n'impliquent que deux partenaires. Il n'y a pas de phénomène de réticulation (donc pas d'agrégation).

Le modèle développé par Whitesides *et coll* repose sur l'additivité des composantes thermodynamiques. En considérant une interaction n-valente, les auteurs ont défini l'énergie libre moyenne d'une interaction ΔG_{moy}^{multi} comme l'énergie libre de l'association totale du système ΔG_n^{multi} divisée par la valence du système (éq. 7)

$$\Delta G_{moy}^{multi} = \frac{\Delta G_n^{multi}}{n} \quad (\text{éq. 7})$$

De cette équation et en revenant à la définition de l'énergie libre (éq. 8), il est facile de déduire la relation entre la constante d'association totale du système K_n^{multi} et la constante d'association moyenne de l'interaction K_{moy}^{multi} (éq. 9)

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad (\text{éq. 8})$$

$$K_n^{multi} = (K_{moy}^{multi})^n \quad (\text{éq. 9})$$

La constante d'association totale K_n^{multi} est généralement nommée « avidité » de l'interaction. Cette dénomination permet de la différencier de l'affinité d'une interaction monovalente K^{mono} . L'avidité est bien souvent très supérieure à l'affinité des interactions monovalentes qui la composent.

I.3.4. La coopérativité

Whitesides *et coll* ont observé que l'énergie libre moyenne d'une interaction entre un ligand et un récepteur au sein d'une interaction polyvalente pouvait être plus grande, plus faible ou égale à l'interaction monovalente. En se basant sur les 4 équations suivantes (eq. 10 – 13), ils ont défini un degré de coopérativité α au sein de l'interaction multivalente.

$$\Delta G_{moy}^{multi} = \alpha \Delta G^{mono} \quad (\text{eq. 10})$$

$$n \Delta G_{moy}^{multi} = \Delta G_n^{multi} = \alpha n \Delta G^{mono} \quad (\text{eq. 11})$$

$$K_n^{multi} = (K_{moy}^{multi})^n = (K^{mono})^{\alpha n} \quad (\text{eq. 12})$$

$$\alpha = \frac{\lg(K_n^{multi})}{\lg(K^{mono})^n} \quad (\text{eq. 13})$$

Le degré de coopérativité correspond à l'influence d'une première association ligand-récepteur sur l'affinité d'un deuxième site du récepteur pour un second ligand. Lorsque $\alpha > 1$, la coopérativité est dite positive (ou synergique) et la première interaction augmente l'affinité des suivantes. Si $\alpha < 1$, la coopérativité est négative (interférente) et la première association entraîne une diminution de l'affinité des autres interactions. Enfin, si $\alpha = 1$, la coopérativité est nulle (additive) et chaque association est indépendante des autres.

Très peu de cas de coopérativité positive ont été observés. Le cas le plus marquant est l'association allostérique du dioxygène à l'hémoglobine. Cette protéine est capable de lier jusqu'à 4 molécules de dioxygène et chaque association amplifie l'affinité des sites de liaison restant.

La détermination de la coopérativité peut se mesurer via une expérience de Hill-plot ou Scatchard plot.

I.3.5. Le facteur d'amélioration β

Il est important de différencier les informations apportées par l'avidité et la coopérativité. En effet, une vision simpliste serait de penser que si l'avidité d'une molécule n-valente est supérieure à l'affinité de l'interaction monovalente, alors la coopérativité serait positive. Découlant de l'équation 13 établie par Whitesides *et coll*, si $\alpha > \frac{1}{n}$ alors $K_n^{multi} > K^{mono}$. Or il est tout à fait possible d'avoir $\frac{1}{n} < \alpha < 1$, ce qui implique une augmentation de l'avidité mais une coopérativité négative.

Pour rendre compte de cette réalité, Whitesides *et coll* ont introduit le concept du facteur d'amélioration β qu'ils ont défini par l'équation :

$$\beta = \frac{K_n^{multi}}{K^{mono}} \text{ (éq. 14)}$$

Ainsi, lorsqu'un ligand multivalent possède un $\beta > n$, ce dernier est intéressant à étudier même si la coopérativité est négative car l'affinité du ligand n-valent est supérieure à n fois l'affinité du ligand monovalent.

I.3.6. Les différents types d'interactions multivalentes

Divers mécanismes d'association sont impliqués dans la formation d'interactions multivalentes et sont à l'origine d'une augmentation visible de l'avidité. En 2002, Kiessling *et al* ont publié une étude approfondie sur ces mécanismes et en ont identifié 5 régissant les interactions multivalentes : l'effet chélate (Figure 9a), l'effet statistique (Figure 9b), le regroupement de récepteur (Figure 9c), la présence d'un site secondaire (Figure 9d), la stabilisation stérique (Figure 9e).⁶⁷

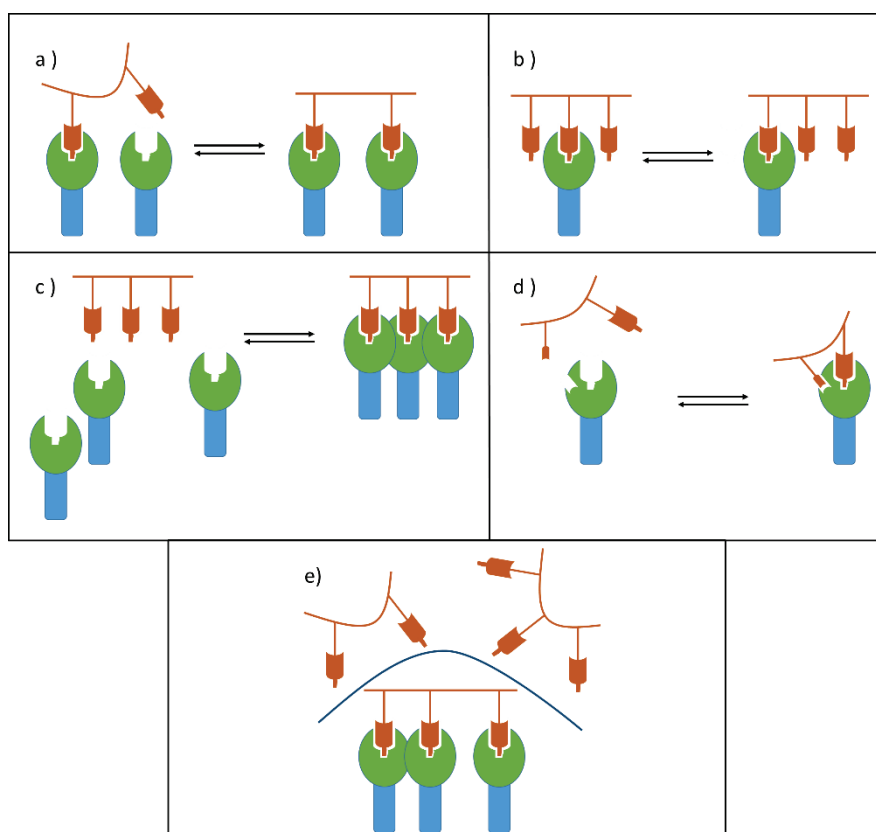


Figure 9 : Représentation des différents types d'interactions multivalente : a) Effet chélate. b) Effet statistique. c) Regroupement de récepteur. d) Site secondaire. e) Stabilisation stérique.

I.3.6.1. L'effet chélate

L'effet chélate (Figure 9a) est de loin le phénomène le plus étudié en multivalence car à la source des plus grandes amplifications d'affinité observées. Ce phénomène se base sur la notion de concentration effective (C_{eff}) introduite par Lees *et al.*⁶⁸ Dans le cas d'une interaction entre un ligand et un récepteur multivalent, la première association sera obligatoirement intermoléculaire. Néanmoins, une compétition aura lieu entre interactions intra- ou intermoléculaires pour les associations suivantes. Le ligand étant n-valent, il est plausible qu'un deuxième épitope du ligand soit à proximité d'un autre site de liaison (Figure 10) créant localement une concentration effective en ligand C_{eff} différente de celle du ligand en solution C_{sol} .

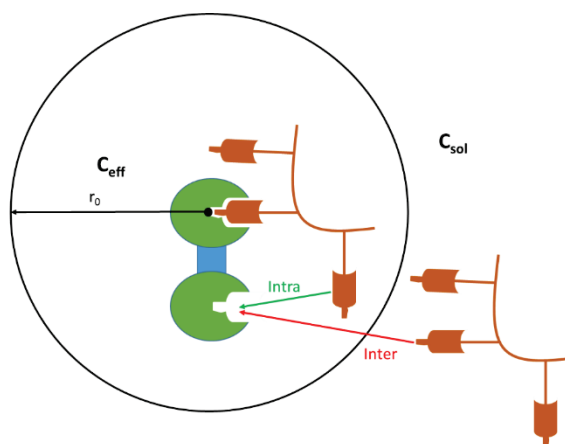


Figure 10 : Compétition entre association intramoléculaire (chélate) et intermoléculaire en fonction de C_{eff}

Si $C_{eff} > C_{sol}$, l'association intramoléculaire (chélate) sera favorisée. Si $C_{eff} < C_{sol}$, ce qui peut se produire si l'espaceur entre les deux épitopes ne permet pas de joindre deux sites de liaison, ce sera l'interaction intermoléculaire qui deviendra majoritaire.

La concentration effective est exprimée selon l'équation :

$$C_{eff} = \frac{1}{N_A} \left(\frac{3}{2\pi r_0^2} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (\text{éq. 15})$$

Avec N_A le nombre d'Avogadro et r_0 la racine des carrés moyens de la distance entre le deuxième épitope du ligand et le site de liaison.⁶⁹ Néanmoins, il est très difficile de déterminer mathématiquement r_0 . Plusieurs modèles existent mais aucun ne rend parfaitement compte de la réalité.

La puissance de l'effet chélate a été mise en évidence par les travaux de Bundle *et coll* sur la Shiga-Like Toxin.⁷⁰ Cette protéine de type AB₅ est composée d'une sous-unité A possédant une activité enzymatique et cinq sous-unités B permettant l'attache de la toxine. Chaque sous-unité B comporte 3 sites de reconnaissance, ainsi 15 sites de liaison sont disponibles sur la même face de la protéine. Le ligand naturel de la protéine est le glycolipide Gb₃ (α -D-Gal(1→4) β -D-Gal(1→4) β -D-Glc(1→O-ceramide) (Cf Chapitre 1, Figure 3), le trisaccharide étant l'épitope. Bundle *et coll* ont synthétisé un ligand décavalent, ayant une affinité 1 million de fois supérieure

au trisaccharide. Une analyse cristallographique a révélé que le ligand engage sous forme de sandwich deux protéines avec 5 liaisons simultanées sur chaque motif AB₅ (Figure 11) d'où le nom donné au ligand : STARFISH.

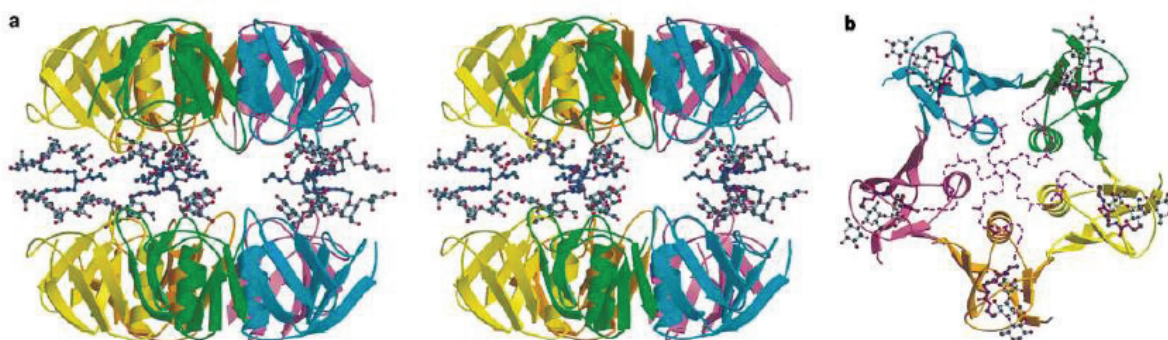


Figure 11 : Structure cristalline de la Shiga-Like-Toxin en présence de STARFISH⁷⁰

I.3.6.2. L'effet statistique

Un deuxième mécanisme lié à la concentration effective et se rapprochant de l'effet chélate a été théorisé par Brewer *et al* (Figure 9b).^{71,72} Ce modèle, connu sous le nom de « Bind and jump » ou « effet statistique », rend compte que lors de l'association d'un ligand multivalent à un récepteur mono- ou multivalent, la concentration effective en ligand augmente autour du site de liaison. Ainsi, lors de la dissociation du complexe, la probabilité d'une deuxième association immédiate avec un autre épitope du ligand multivalent est fortement augmentée. Ceci a pour conséquence de diminuer fortement la constante de dissociation et d'augmenter ainsi l'affinité.

I.3.6.3. Le regroupement de récepteur

Le troisième mécanisme décrit par Kiessling *et al* est le regroupement de récepteur. Ce phénomène a notamment lieu à la surface des cellules ou les protéines exprimées en surface sont mobiles. Lors de l'addition d'un ligand multivalent, les récepteurs vont se rapprocher les uns des autres pour se lier aux divers épitopes du ligand (Figure 9c). Ce phénomène est la source de nombreux phénomènes biologiques dont la transduction du signal.⁷³⁻⁷⁵

I.3.6.4. Le site secondaire d'association

Certains récepteurs présentent un site secondaire de liaison à proximité du premier et ne reconnaissant pas le même épitope (Figure 9d). La synthèse d'un ligand possédant les deux épitopes peut fortement améliorer l'affinité. Guiard *et al* ont ainsi développé des ligands bifonctionnels possédant comme épitopes un L-fucose et divers groupements aromatiques.⁷⁶ Dans cette étude, ils démontrent que les affinités de leurs ligands bifonctionnels sont fortement augmentées par rapport à ceux n'ayant qu'un épitope de L-fucose.

I.3.6.5. La stabilisation stérique

Un dernier mécanisme correspond à une stabilisation stérique du complexe. Si le ligand n-valent est imposant, il peut gêner l'accès aux ligands compétiteurs (Figure 9e). Bien que ce mécanisme soit connu dans la science des colloïdes, il est très difficile de prouver cet effet au niveau de l'interaction lectine-saccharide.²⁰

I.3.6.6. La réticulation

Des mécanismes agrégatifs peuvent aussi avoir une influence sur l'affinité. Lorsque la distance entre deux épitopes du ligand ne permet pas de lier deux sites de liaison d'un même récepteur (effet chélate). Il est possible de lier deux sites de liaisons de deux récepteurs différents, créant ainsi un réseau réticulé.

Deux types de réseaux réticulés existent⁷⁷ : une réticulation de type 1 (Figure 12a) implique la divalence du ligand et du récepteur. Le réseau créé sera linéaire et souvent soluble. Si l'un des deux partenaires à une valence supérieure à deux, la réticulation du réseau, dite de type 2 (Figure 12b), devient plus complexe et se propage dans les 3 directions de l'espace. Les agrégats générés sont pour la plupart insolubles et conduisent à une précipitation qui peut compliquer fortement l'utilisation des techniques d'analyses classiques des interactions lectine-saccharide.

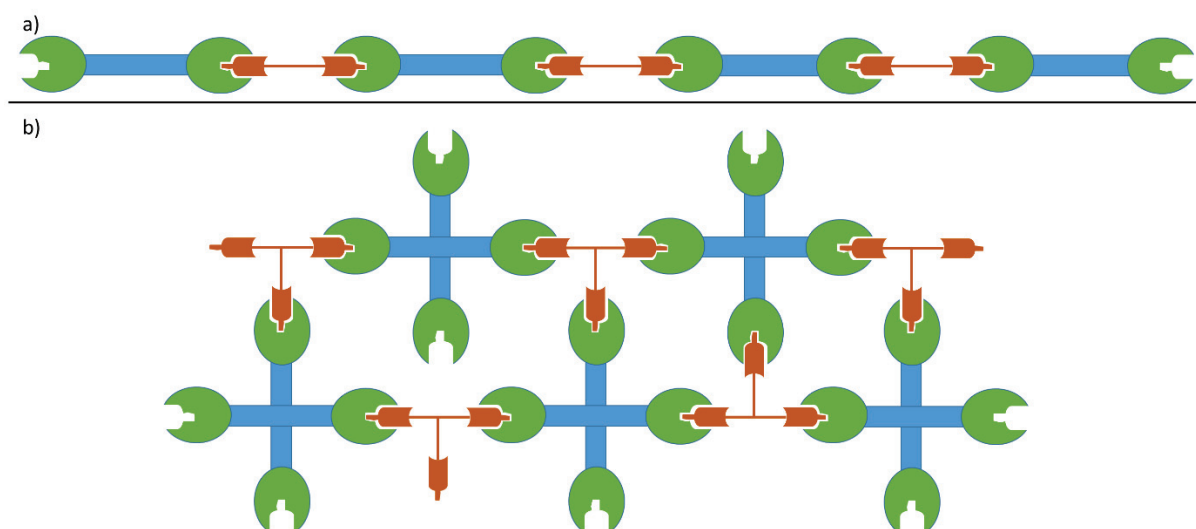


Figure 12 : a) Réticulation de type 1 (structure 2D). b) Réticulation de type 2 (structure 3D)

I.3.6.7. Le chélate agrégatif

La complexité de l'étude des interactions lectine-saccharide provient de l'interconnexion entre ces divers mécanismes d'association. Ainsi, il est complexe d'attribuer uniquement à l'un d'entre eux une amplification d'affinité observée. Néanmoins, certains peuvent être complémentaires et mener à des amplifications remarquables. Un exemple développé dans notre groupe concerne un ligand de type calixarène 1,3-alterné possédant un K_d de 176 nM pour LecA.^{34,35} Dans une première étude étudiant l'influence du nombre et de la présentation des saccharides à la lectine via des calix[4]arènes, le calix[4]arène 1,3-alterné **I-1** s'était démarqué

(Figure 13). Pour expliciter ce résultat, des études de docking moléculaire ont été menées et ont permis de supposer un mécanisme chélate couplé à une réticulation de type 1 (Figure 14b).

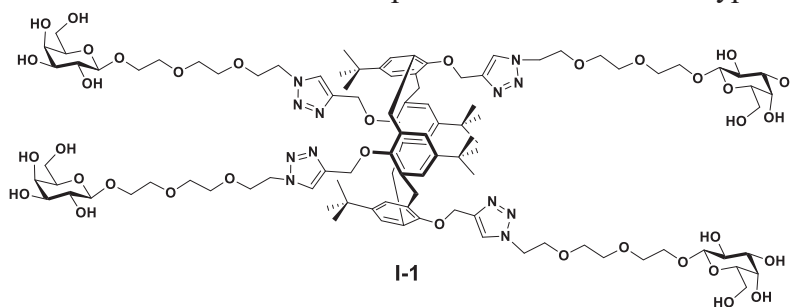


Figure 13 : Calix[4]arène 1,3-alterné tétragalactosylé

Cette étude théorique a pu être validée par des études AFM (Figure 14). De ces dernières, le mécanisme de chélate agrégatif ressort validé. Ainsi, les saccharides d'un même ligand vont s'associer par paire avec une lectine, permettant l'enchaînement lectine-calix[4]arène-lectine...

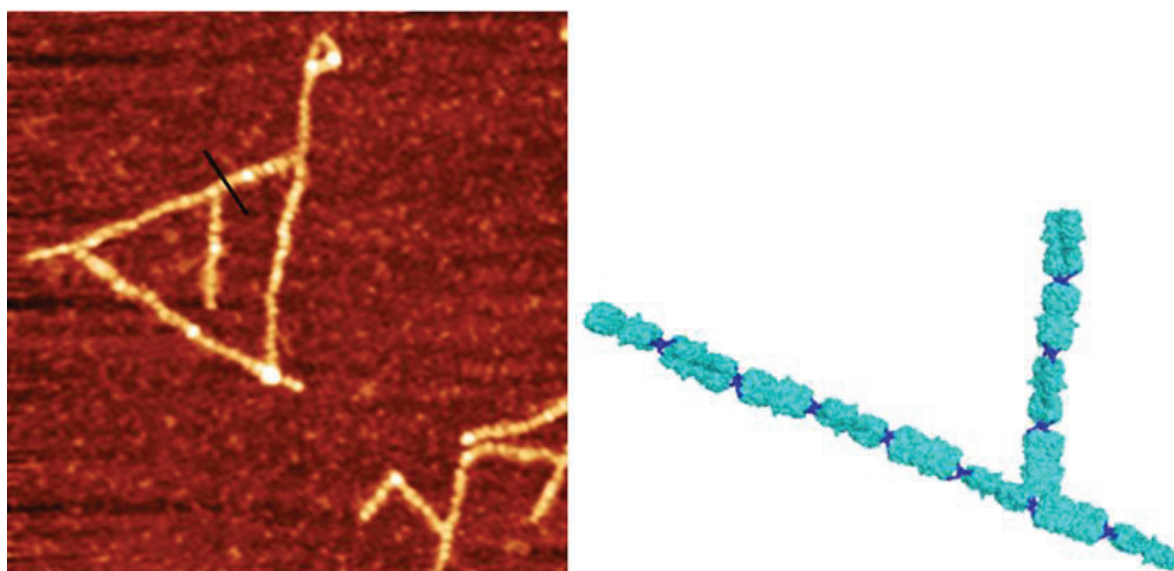


Figure 14 : a) Image AFM des filaments de LecA et du calix[4]arène 1,3-alterné. b) Modélisation moléculaire du chélate agrégatif entre LecA et le calix[4]arène 1,3-alterné.³⁴

Les travaux effectués au sein de notre laboratoire sur différents cœurs portant un nombre variable d'épitopes de LecA et LecB nous ont permis de mieux comprendre les attentes des deux lectines en termes de valence et d'orientation des saccharides dans l'espace. Toutefois, la synthèse de ces divers glycoclusters se révèle longue, fastidieuse et couteuse. De plus, les molécules formées ne balaient pas toutes les valences possibles et même si d'excellents résultats ont été obtenus avec le calix[4]arène 1,3-alterné, il n'est pas à exclure qu'une molécule très similaire puisse avoir une meilleure activité.

Pour balayer ce champ des possibles, une première méthode consisterait à continuer de synthétiser de multiples glycoclusters de structures et de valences variées pour vérifier l'absence d'un meilleur ligand de la lectine. Cette approche n'est bien évidemment pas la plus économe ni la plus pratique. Une autre méthodologie consiste à se baser sur une technique émergente : la chimie combinatoire dynamique (CCD). Dans cette approche, le système est

dynamique et c'est la molécule cible qui se charge d'agencer les différents constituants pour obtenir son meilleur inhibiteur.

Fondé sur nos précédents résultats, nous avons une bonne connaissance des attentes des lectines. Ajouter un degré de dynamisme nous permettrait de visualiser si une molécule plus pertinente que le calix[4]arène 1,3-alterné existe.

Dans la prochaine partie, nous allons aborder le concept de CDD ainsi que ses avantages et ses défauts via la présentation de divers exemples tirés de la littérature.

I.4. LA CHIMIE COMBINATOIRE DYNAMIQUE

I.4.1. Introduction à la chimie combinatoire dynamique

I.4.1.1. La chimie combinatoire

A l'aube des années 90, la chimie combinatoire suscita un engouement chez les grands groupes pharmaceutiques.^{78,79} La perspective d'identifier rapidement de nouvelles molécules active par la modification itérative de molécules naturelles entraîna le développement de la recherche par chimie combinatoire.⁸⁰ Pharmacia (Pfizer désormais) a ainsi développé le Zyvox par cette méthodologie. Un exemple de chimie combinatoire sont les travaux sur les benzopyranes **I-2** et **I-3** décrits dans une série de publications par le groupe de Nicolaou (Figure 15).⁸¹⁻⁸³ Un recensement bibliographique indique que près de 4000 composés synthétiques ou naturels contenant le motif benzopyrane, ont été étudiées pour leurs propriétés pharmacologiques.

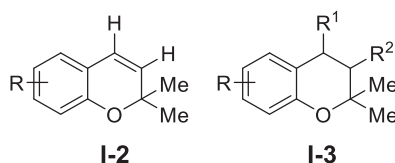


Figure 15 : Structure des benzopyranes sélectionnés par Nicolaou *et coll.*

Le groupe fonde sa stratégie sur l'immobilisation du benzopyrane **I-4** par un motif sélénoéther lié à une résine (Schéma 1). Après modifications, le composé formé **I-7** est libéré via l'oxydation du sélénium et une syn-élimination. En partant de 9 structures benzopyranes portant un aldéhyde et dérivés de la structure **I-2**, 10 000 composés ont été synthétisés via diverses réactions (glycosidation, amination réductrice, condensation de Knoevenagel...) et en utilisant un système d'encodage optique (NanoKans).

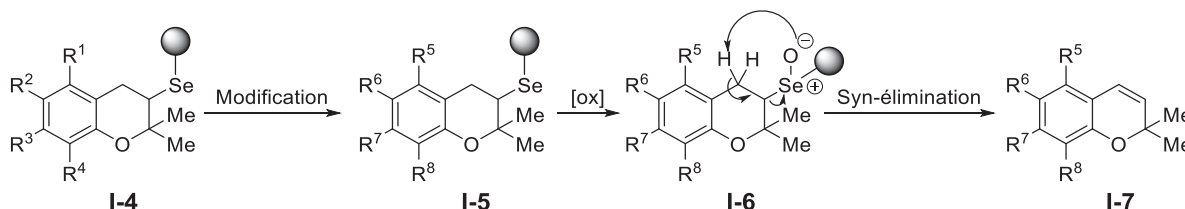


Schéma 1 : Modification par chimie combinatoire des dérivés benzopyranes et relargage en solution via syn-élimination du lien sélénoéther

Les composés obtenus présentaient des groupements chimiques variés mais restaient proches en termes de masse moléculaire, de nombre total d'atomes et de lipophilie. Les auteurs démontrent aussi la possibilité de post-fonctionnaliser les composés synthétisés grâce à la

double liaison issue de la syn-élimination. Dans cette série de publication, Nicolaou montre qu'après une phase d'optimisation il est possible de créer des chimiothèques combinatoires de grande taille en s'inspirant de structures naturelles.

Néanmoins, la chimie combinatoire comporte des inconvénients. En effet, il est possible de passer à côté de composés actifs (seulement 92% des espèces ont été identifiées par MS et seulement 69% ont une pureté dépassant les 80%) et l'identification d'une molécule dans un mélange de plusieurs milliers implique de multiplier les tests d'activités et d'optimiser les méthodes d'analyses. Depuis, l'industrie pharmaceutique s'est tournée vers des méthodes conjuguant la chimie computationnelle et chimie combinatoire pour réduire le nombre de composés synthétisés et optimiser le processus de drug discovery. Ainsi, sur les candidats cliniques issus de la synthèse chimique de 2016 et 2017, seuls 29% proviennent d'un criblage.⁸⁴ La majorité dérivant de composés déjà connus (43%). Le faible impact de la chimie combinatoire se retrouve au niveau du nombre de médicaments issus de la synthèse et autorisés à entrer sur le marché par la FDA (Figure 16).⁸⁵

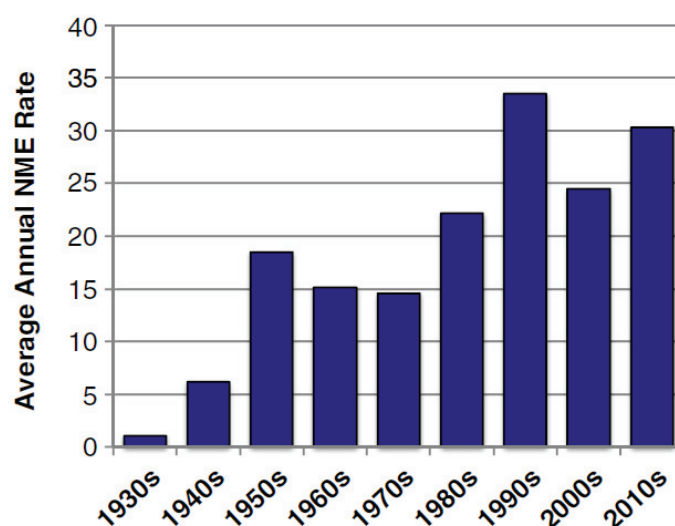


Figure 16 : Nombre de nouveaux médicaments approuvés par la FDA par décennie.

I.4.1.2. La chimie combinatoire dynamique

Au milieu des années 90, Lehn et Sanders se sont indépendamment intéressés aux réactions sous contrôle thermodynamique. Jusqu'alors, les paramètres physiques (température, pression) étaient exploités pour déplacer les équilibres chimiques et favoriser la formation d'un produit. Leur idée novatrice a consisté à déplacer cet équilibre par un moyen chimique : l'effet « template ». En jouant sur les interactions non-covalentes voire covalentes entre un template et les molécules assemblées par la réaction sous contrôle thermodynamique, il était possible de modifier la distribution des espèces auto-assemblées à l'équilibre et de privilégier certaines combinaisons validant expérimentalement le concept de CCD.

La CCD est définie comme la chimie combinatoire sous contrôle thermodynamique. Les différentes briques moléculaires ou synthons de départ sont capables de s'auto-assembler par liaison covalente ou non covalente pour générer une chimiothèque combinatoire dynamique

d'oligomères (réelle ou virtuelle). Tous les composés la constituant sont en équilibre les uns avec les autres et la distribution des espèces ne dépend que de leur stabilité thermodynamique intrinsèque. Pour atteindre cet état d'équilibre, il est indispensable que soit la réaction de formation, soit la réaction d'interconversion des objets produits soit réversible.

Dans son approche, Lehn décrit les chimiothèques combinatoires comme « virtuelles ». En effet, toutes les combinaisons de composés ne sont pas forcément présentes ou détectables en solution à l'équilibre du fait de la faible stabilité thermodynamique de certaines. Toutefois, tous les composés sont potentiellement synthétiquement accessibles et une modification de l'équilibre peut en provoquer l'apparition ou la formation en quantités détectables. Ainsi, le terme « virtuelle » englobe la notion statistique de combinatoire, i.e. la possibilité de former toutes les espèces statistiquement accessibles dans les conditions opératoires choisies.⁸⁶

La principale caractéristique et l'avantage majeur de la chimie combinatoire dynamique vis-à-vis de la chimie combinatoire traditionnelle provient de son adaptabilité aux conditions réactionnelles. Lorsqu'un stimulus externe ou changement de conditions opératoires (changement de température, pression, pH, introduction d'un template) est appliqué au système, la position de l'équilibre thermodynamique peut être modifiée, entraînant une redistribution des espèces. Ainsi, le système étudié est évolutif et non pas statique.⁸⁷ C'est donc une méthode de criblage qui comprend synthèse et identification via la détection de l'effet template.

Cet avantage a été exploité dans de nombreux domaines : reconnaissance moléculaire, catalyse, auto-réplication, détection.⁸⁸ Une bonne représentation visuelle de la reconnaissance moléculaire d'une petite molécule cible par un oligomère auto-assemblé est celle utilisée par Sanders *et coll* (Figure 17).⁸⁹

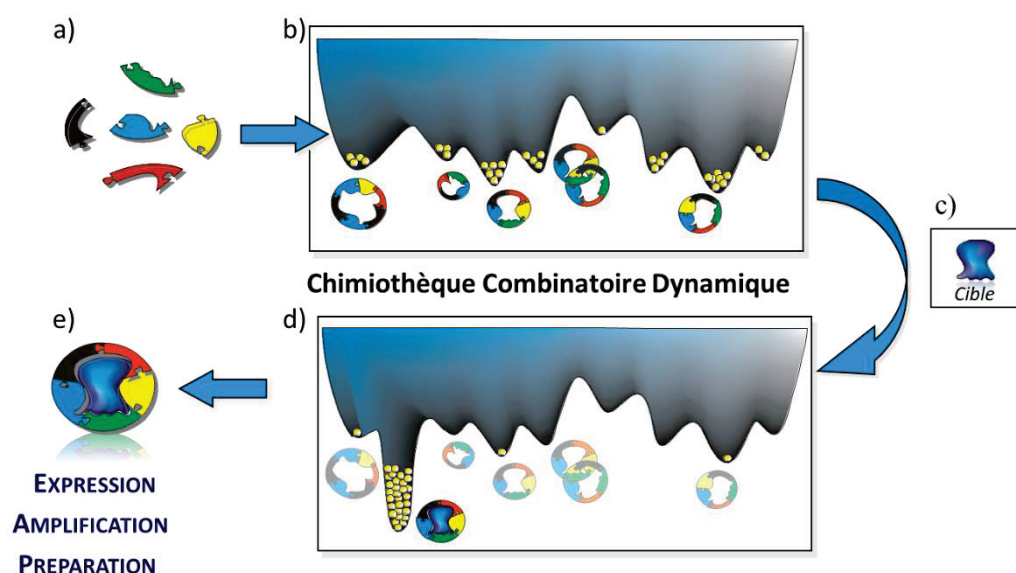


Figure 17 : Représentation schématique d'une expérience de CCD⁸⁹

A chaque début d'expérience, les diverses briques moléculaires sont placées en solution (Figure 17a). Elles vont s'auto-assembler via une réaction réversible pour générer une distribution d'espèces dépendant de la stabilité thermodynamique relative de chaque membre (Figure 17b). Pour cela, une interconversion permanente entre les différents composés formés est nécessaire.

L'addition d'un template peut modifier cet équilibre (Figure 17c). Les oligomères ayant une affinité pour ce dernier vont être stabilisés par formation de complexe (Figure 17d), amplifiant *de facto* leur concentration en solution aux dépens des autres espèces. Ainsi, il est possible de déterminer les meilleurs partenaires moléculaires du template choisi par le biais du phénomène d'amplification, voire l'apparition de nouvelles molécules (Figure 17e).

Le deuxième grand avantage de la CCD par rapport à la chimie combinatoire traditionnelle provient du fait que les processus de synthèse et de sélection se déroulent de façon concomitante limitant ainsi les coûts pour la découverte de nouvelles molécules actives.

Plusieurs précautions doivent être prises lors de la réalisation d'une expérience de CCD. En premier lieu, l'équilibre thermodynamique doit être atteint dans un temps qualifié de « raisonnable ». Idéalement, les oligomères en solution doivent être iso-énergétiques. En effet, la présence d'espèces agissant comme puits thermodynamiques risque d'atténuer de potentielles amplifications en présence du template. La compatibilité entre les conditions d'équilibration du système et le template est aussi nécessaire pour que les phénomènes d'auto-assemblage et de sélection se déroulent de manière simultanée. Enfin, il faut pouvoir stopper l'interconversion incessante ayant lieu à l'échelle microscopique pour pouvoir séparer et quantifier les différentes espèces. En fonction de la réaction utilisée, de nombreuses méthodes ont été développées telles le changement du pH, de la température ou la dérivation d'une des fonctions chimiques impliquées dans la réaction d'échange.⁸⁷

I.4.2. Les différents types de liaisons réversibles

Avec l'essor de la chimie combinatoire dynamique dans les années 2000, de nombreuses réactions réversibles connues ont été à nouveau étudiées. Un classement en trois catégories peut être proposé : covalentes, non-covalentes et de coordination (Tableau 3).⁸⁷

Tableau 3 : Comparaison entre énergie de formation et labilité des liaisons réversibles

Interaction		Energie (kJ/mol)	Labilité
Liaison covalente		150-800	Faible
Liaison de coordination	1 ^{ère} rangée	80-350	Haute
	2 ^{ème} rangée	80-350	Moyenne
	3 ^{ème} rangée	80-350	Faible
Liaison hydrogène		0-20	Haute

Chaque type de liaison possède ses avantages et ses limitations d'un point de vue thermodynamique. Les liaisons non-covalentes ont une labilité élevée permettant d'atteindre rapidement l'état d'équilibre. Néanmoins, la fragilité de l'interaction rend difficile l'étude des molécules formées ainsi que leur isolement. Les liaisons covalentes sont bien plus stables, facilitant l'analyse du système à l'équilibre. Toutefois, la réactivité de la fonction est plus faible, ce qui implique des temps d'équilibration plus long. Les liaisons de coordination se situent entre les deux.

I.4.2.1. La liaison hydrogène

La faible énergie de la liaison hydrogène nécessite de multiplier ces dernières pour obtenir une association forte entre un oligomère et son template. L'appariement des centaines de bases nucléiques permettant la stabilité du double brin d'ADN est un exemple marquant. En CCD, Reinhoudt *et coll* ont à la suite de précédents travaux⁹⁰ décrit la formation réversible de cages moléculaires à partir de calix[4]arènes portant des motifs mélamine et acide isocyanurique (Schéma 2a).⁹¹ Partant des homotrimères de calix[4]arène **I-10** et **I-11** (Schéma 2b) assemblés par l'intermédiaire de six unités 5,5-diéthylbarbiturate **I-8**, ils ont montré par RMN du proton, la recombinaison de ces architectures pour former un mélange d'homo- et d'hétérooligomères (Schéma 2c). La stabilisation des espèces est corrélée à la force des 36 liaisons hydrogènes entre 6 barbiturates et 3 calix[4]arènes. Pour compléter les informations issues de la RMN, la triazine **I-9** a été substituée au barbiturate **I-8** et les assemblages obtenus étudiés en présence de sels d'argent par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La complexation des ions métalliques aux groupements cyano a permis de renforcer la stabilité des assemblages supramoléculaires **I-12** et **I-13** et de détecter les ions moléculaires correspondant. Ainsi, la CCD est capable de générer des complexes supramoléculaires stabilisés uniquement par liaison hydrogène. Cette stratégie s'appuie sur les mécanismes mis en place par la nature pour former des architectures supramoléculaires comme l'ADN.

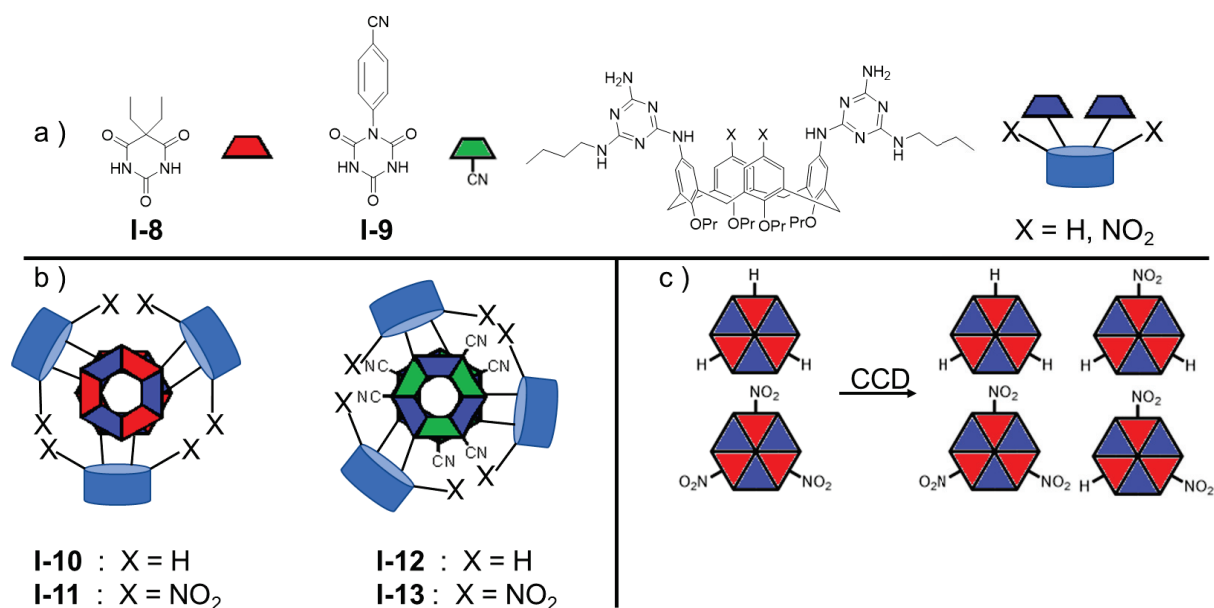


Schéma 2 : a) Briques moléculaires utilisées en CCD. b) Structure supramoléculaire formée. c) Formation d'hétérooligomères à partir d'homooligomères

I.4.2.2. La liaison de coordination

L'un des premiers travaux portant sur l'application de la CCD aux liaisons de coordination revient au groupe de Lehn. En 1997, celui-ci a montré l'auto-assemblage d'hélicates métalliques dont la taille est dictée par le contre-ion grâce à la formation de complexe d'inclusion hélicate-anion.⁹² Lorsqu'un ligand tris-2,2'-bipyridine **I-14** est placé en présence de

FeCl_2 et chauffé dans l'éthylène glycol, un hélicate **I-15** composé de 5 $\text{Fe}(\text{bipy})_3$ (= Hôte) auto-assemblés autour d'un anion Cl^- (= Invité) est le seul et unique produit de la chimiothèque (Schéma 3). Ayant observé qu'un changement du contre-ion du fer (SO_4^{2-} , SiF_6^{2-} , BF_4^-) induit la formation d'hélicates différents, le groupe a exploré l'interconversion entre les architectures obtenues. L'interconversion a été obtenue en substituant le template sulfate par un chlorure, induisant, dans les conditions d'auto-assemblage, la conversion de l'hexahélicate (**I-16**) en pentahélicate (**I-15**). L'interconversion de ces deux supramolécules démontre la capacité de la CCD à s'adapter à des changements *a priori* perçus comme anodin par l'expérimentateur (Nature et taille du contre-ion) mais qui ont des effets majeurs sur la stabilité des assemblages supramoléculaires formés.

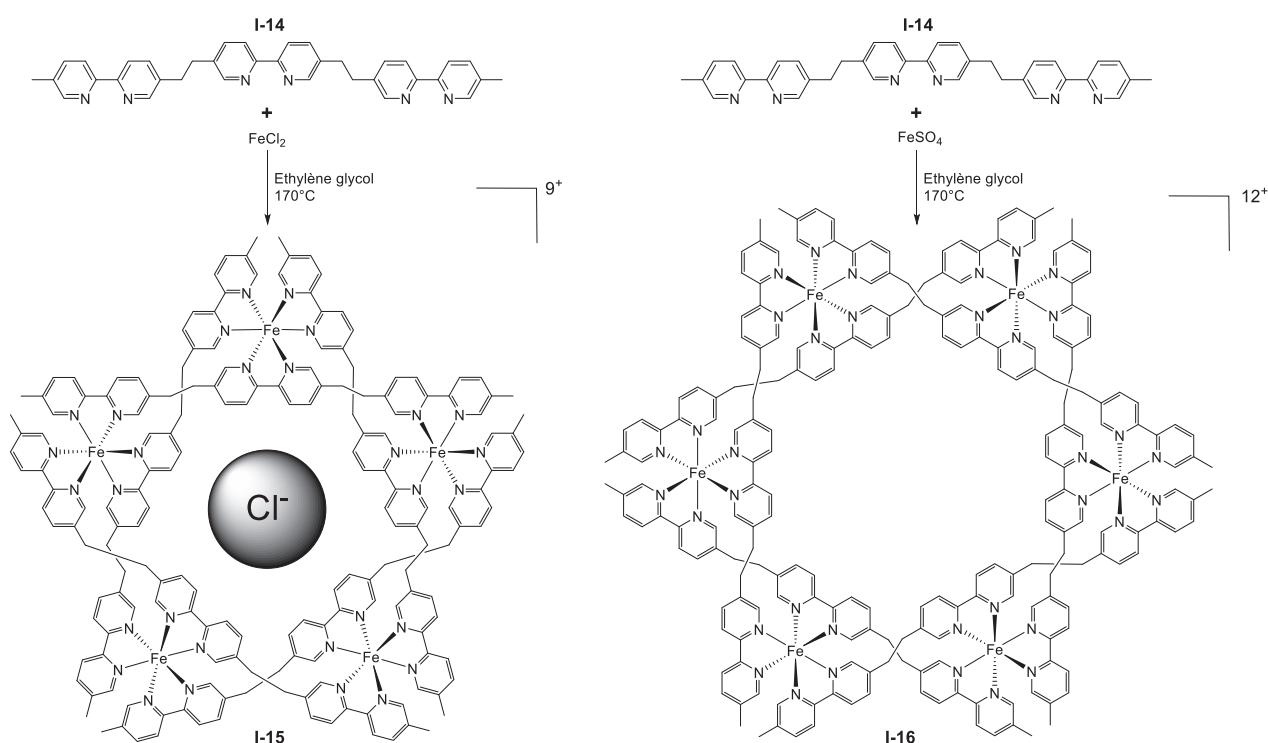


Schéma 3 : Formation de pentahélicate (**I-15**) et hexahélicate (**I-16**)

Un exemple plus récent développé par le groupe de Nitschke implique l'auto-assemblage de cages tétraédriques de type Zn_4L_6 à l'aide de liaisons métal-ligand.⁹³ A chaque sommet du tétraèdre, un atome de zinc est coordonné par 4 ligands bidentate. Un exemple impliquant un motif espaceur naphthalène diimide entre les sites de liaison, i.e. sur les arêtes du tétraèdre est représenté au Schéma 4.

Cette famille de cages moléculaires tétraédriques permet de reconnaître sélectivement deux cibles : un fullerène C_{70} et l'éther couronne **C** (Schéma 5). Deux ligands **L** furent sélectionnés pour former les cages tétraédriques. Le premier, un naphthalène diimide **N**, a été choisi pour son caractère déficitaire en électron. En se fondant notamment sur les travaux de Sanders,⁹⁴ où l'éther couronne **C** riche en électron formait un caténane avec un naphthalène diimide, ils ont émis l'hypothèse qu'un phénomène de caténation puisse avoir lieu sur les arêtes. La porphyrine **P** a été sélectionnée pour sa similitude structurale avec **N**. En effet, les deux molécules sont planes avec un diamètre d'environ 18.4 Å. Les cages tétraédriques formées avec **N** ou **P** sont

donc de dimensions similaires et leur cavité est appropriée à l'inclusion du fullerène C_{70} par des interactions π .

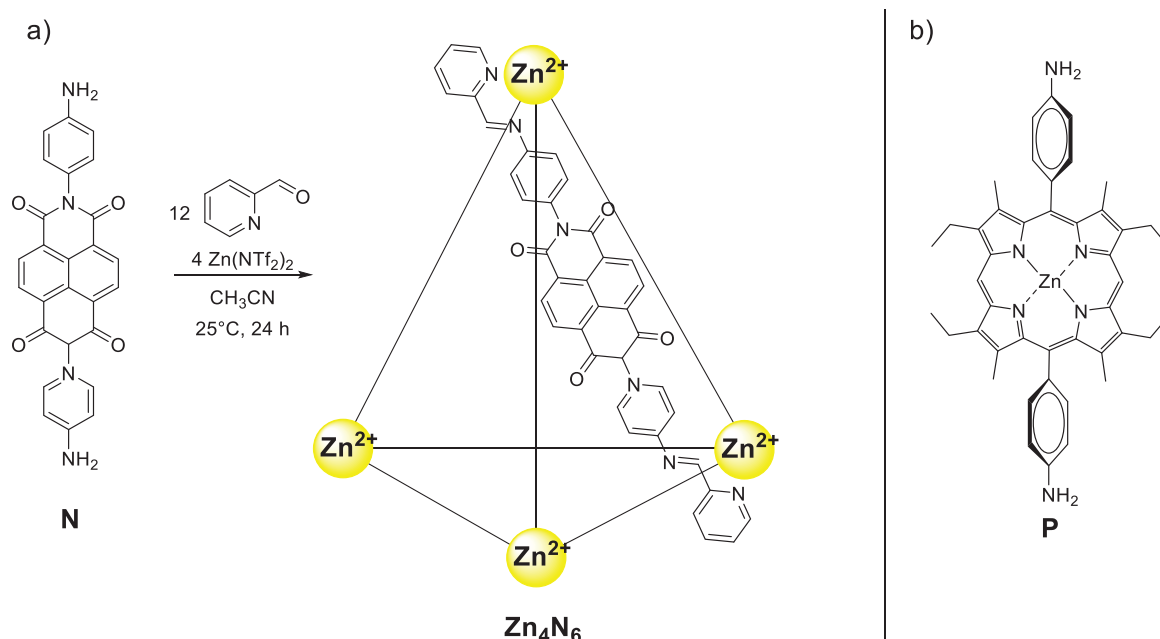


Schéma 4 : a) Synthèse d'une cage tétraédrique en présence de naphthalène diimide **N**. b) Porphyrine **P**.

Des tests furent menés et un phénomène de caténation de l'éther couronne **C** en présence de la cage moléculaire Zn_4N_6 fut observé par ESI-MS (Schéma 5). En revanche, l'encapsulation du fullerène n'eut lieu qu'en présence du complexe Zn_4P_6 . Ceci fut démontré par ESI-MS et RMN du proton. Le groupe de Nitschke s'est alors tourné vers la génération de chimiothèques mixtes.

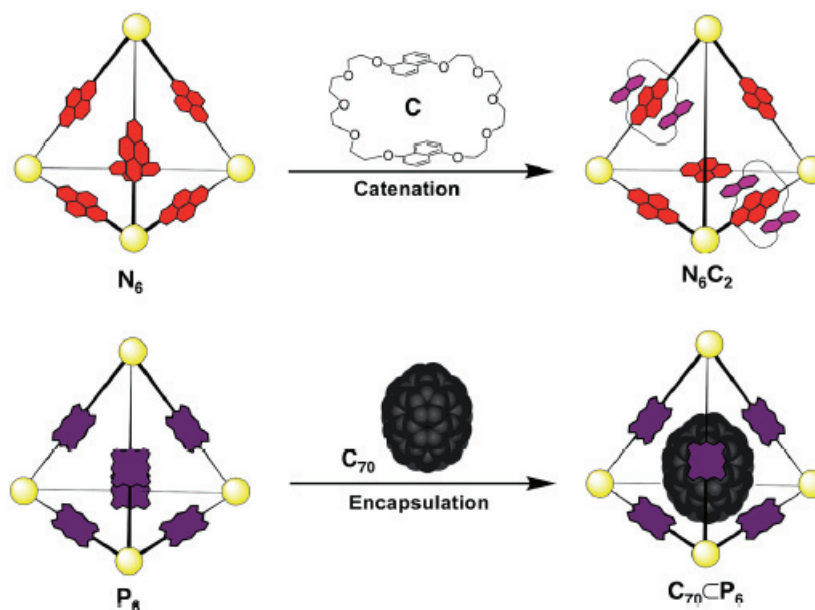


Schéma 5 : En jaune : atome de zinc ; en rouge : naphthalène di-imide **N** ; en violet clair : éther couronne **C** ; en violet foncé : porphyrine **P**. a) Caténation de l'éther couronne **C** en présence d'une cage Zinc + naphthalène diimide. b) Encapsulation d'un fullerène C_{70} en présence d'une cage zinc + porphyrine.

En mélangeant le sel de zinc, l'aldéhyde, la porphyrine et le naphthalène, toutes les espèces possibles (Zn_4N_6 , Zn_4N_5P , $Zn_4N_4P_2$, $Zn_4N_3P_3$, $Zn_4N_2P_4$, Zn_4NP_5 , Zn_4P_6) ont été observées à l'équilibre par spectrométrie de masse (Schéma 6). Le grand nombre d'espèces générées ne permettant d'envisager une analyse par RMN, une stratégie basée sur l'ESI-FTICR-MS a permis de déterminer les quantités relatives des différentes espèces en solution. Lorsque le fullerène est ajouté, un déplacement d'équilibre est observé et seuls les complexes homoleptiques sont formés. Le fullerène n'est identifié que dans le complexe d'inclusion avec Zn_4P_6 . A l'opposé, l'addition de l'éther couronne **C** déplace l'équilibre vers une amplification des complexes hétéroleptiques, notamment $Zn_4N_1P_5$ et $Zn_4N_4P_2$, et la disparition des cages moléculaires homoleptiques bien que Zn_4N_6 soit capable de reconnaître l'éther couronne.

Dans cette publication, Nitschke *et coll* démontrent la capacité de la CCD à différencier avec des objets structurellement proches des molécules cibles. La caténation de l'éther couronne **C** avec le naphthalène diimide **N** était attendue mais l'encapsulation du fullerène n'a lieu qu'en présence du ligand **P** alors que les deux cages moléculaires homoleptiques ont les mêmes dimensions et des caractéristiques électroniques proches.

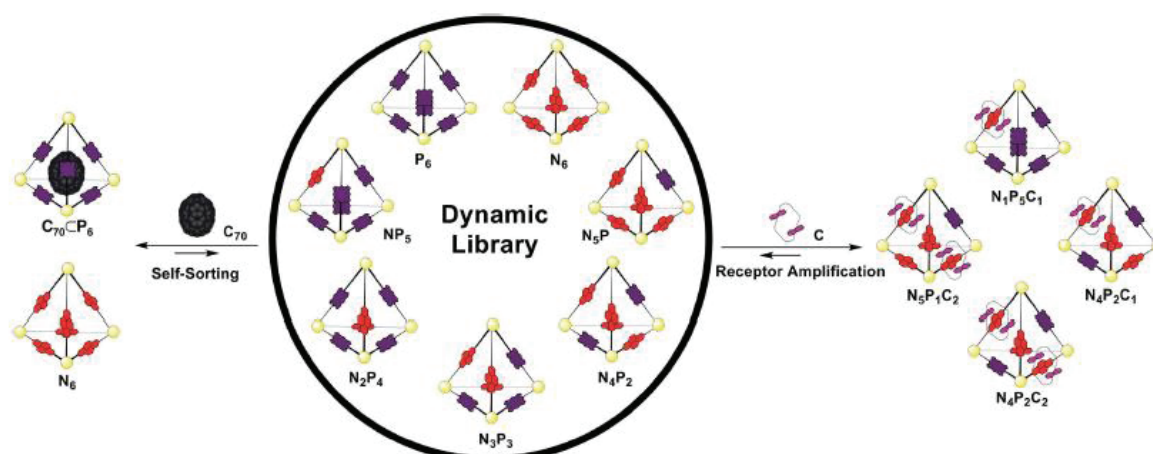


Schéma 6 : Sélection et amplification des espèces issues de la chimiothèque mixte **N** et **P** en présence de fullerène C_{70} ou d'un éther couronne **C**.

A travers ces deux exemples de CCD utilisant les liaisons de coordination comme mécanisme réversible pour générer des entités supramoléculaires, nous avons vu que l'utilisation d'un template capable de développer des interactions hôte-invité est un *stimulus* très efficace pour entraîner un déplacement de l'équilibre.

I.4.2.3. Les liaisons covalentes réversibles

Les liaisons covalentes réversibles sont les plus usitées en CCD. En effet, leur grande stabilité ainsi qu'un contrôle des modalités la plupart du temps facilité pour figer la chimiothèque combinatoire dynamique permettent d'analyser l'équilibre en solution. Diverses méthodes ont été développées pour analyser les oligomères formés. L'analyse par RMN est très rapidement limitée par le nombre d'espèces formées. En effet, au-delà de 4 ou 5 espèces, il devient très

difficile d'analyser le spectre obtenu. La spectrométrie de masse couplée à une technique séparative permet d'identifier les composés de chimiothèques générant une trentaine d'oligomères.⁸⁸ Au-delà, d'autres méthodes doivent être employées pour identifier les meilleurs ligands telle l'analyse par déconvolution. Contrairement aux liaisons non-covalentes, il est beaucoup plus simple d'isoler les espèces formées notamment par les techniques chromatographiques séparatives usuelles.

Le Schéma 7 résume les types de réaction de formation des liaisons réversibles les plus couramment utilisées en CCD.

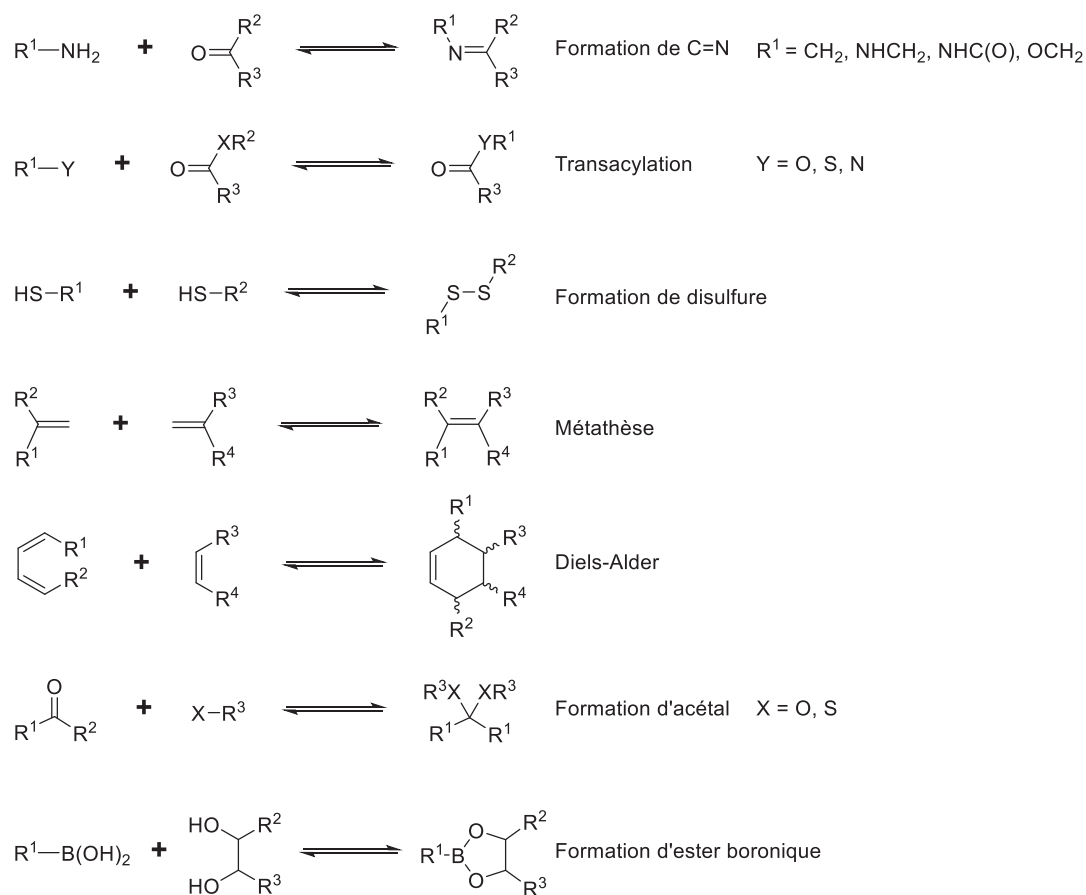


Schéma 7 : Liaisons réversibles couramment utilisées en CCD.

Un exemple de CCD fondée sur une liaison covalente a été développé par le groupe de Nicolaou sur la vancomycine.⁹⁵ Ce composé bioactif est utilisé contre les bactéries à Gram positif. Il reconnaît le motif terminal Lys-D-Ala-D-Ala des peptidoglycanes bactériens et empêche la formation de la paroi des bactéries. Ayant précédemment décrit la synthèse totale de la vancomycine (Figure 18),⁹⁶ les auteurs ont cherché à augmenter son activité par dimérisation grâce à la CCD. Il était connu que le dimère de la vancomycine était plus actif que l'unité monomérique. Nicolaou *et al* ont synthétisé plusieurs variants de la vancomycine (Figure 18) via (1) une modification du premier acide aminé permettant de faire varier le domaine de reconnaissance de la vancomycine (R = H / β -Ala / L-Asn / D-LeuNMe / γ -Abu / L-Arg / L-Phe) et (2) par l'ajout d'un bras espaceur de longueur variable au niveau de l'amine du saccharide déoxy permettant l'introduction d'une fonction alcène terminale, apte à faire une réaction de métathèse pour créer un composé dimérique.

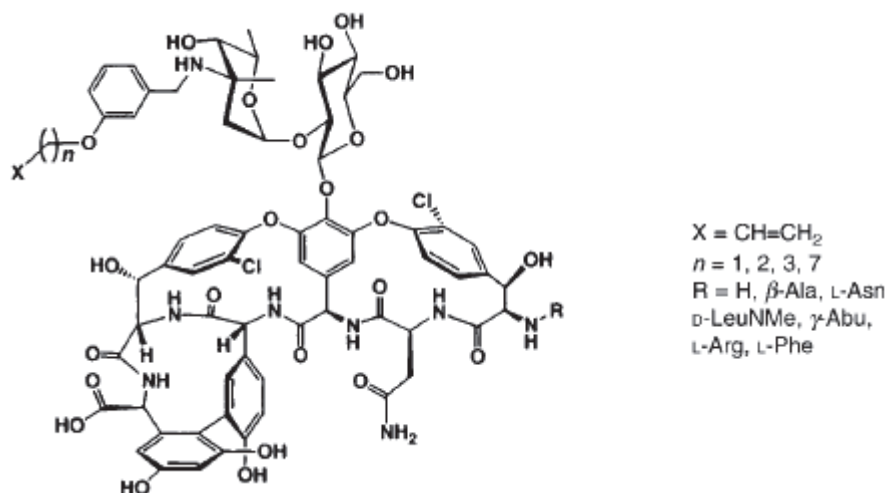


Figure 18 : Divers dérivés de la vancomycine synthétisés pour la CCD.

La dimérisation de 8 briques moléculaires [(R = LeuNMe, $n = 1$), (R = LeuNMe, $n = 3$), (R = β -Ala, $n = 1$), (R = β -Ala, $n = 3$), (R = L-Asn, $n = 1$), (R = L-Asn, $n = 3$), (R = H, $n = 1$), (R = H, $n = 3$)] par métathèse catalysée au ruthénium et en présence du motif Lys-D-Ala-D-Ala a produit 30 des 36 dimères attendus (analyse MS). L'étude a permis de montrer que la longueur du bras espaceur devait être la plus courte possible pour obtenir la meilleure affinité pour le tripeptide cible. De plus, la *N*-méthyl-L-leucine a été identifiée chez six des sept dimères les plus abondants comme un potentiel pharmacophore-clé.

La synthèse des 8 homodimères et de l'hétérodimère [(R = LeuNMe, $n = 1$) / (R = β -Ala, $n = 1$)] a été entreprise et leurs activités antibactériennes mesurées. Les résultats obtenus corrélaient avec ceux issus de la CCD et les composés comportant une *N*-méthyl-L-leucine restent les plus actifs. Dans cet exemple, l'utilisation de la CCD a permis de découvrir de nouveaux dérivés actifs de la vancomycine. De plus, les activités antibactériennes de l'homodimère [(R = LeuNMe, $n = 1$) / (R = LeuNMe, $n = 1$)] se révélèrent meilleures que celles de la vancomycine (de facteurs allant de 25 à 100) ou de son dimère (de facteurs allant de 2 à 10) pour toutes les souches de bactérie étudiées.

I.4.3. Les équilibres dynamiques multiples

Au cours de son développement, la chimie combinatoire dynamique s'est rapidement enrichie en termes de liaisons réversibles utilisables individuellement. Toutefois, une avancée majeure a été la génération de chimiothèques impliquant plusieurs liaisons réversibles activées de manière simultanée ou séquentielle permettant ainsi d'augmenter la complexité des objets moléculaires formés.

En 2007, Nitschke *et coll* ont développé des systèmes alliant jusqu'à 3 équilibres dynamiques.⁹⁷ Leur modèle se basait sur la formation d'imines, de disulfures et de liaisons de coordination. En associant en solution les disulfures **I-24** et **I-25**, la 2-formylpyridine **I-27** et du tétrafluoroborate de cuivre (I), ils ont observé la formation préférentielle du complexe de cuivre

tétracoordiné **I-28**, incorporant toutes les molécules précédemment citées à l'exception du disulfure **I-25** (Figure 19).

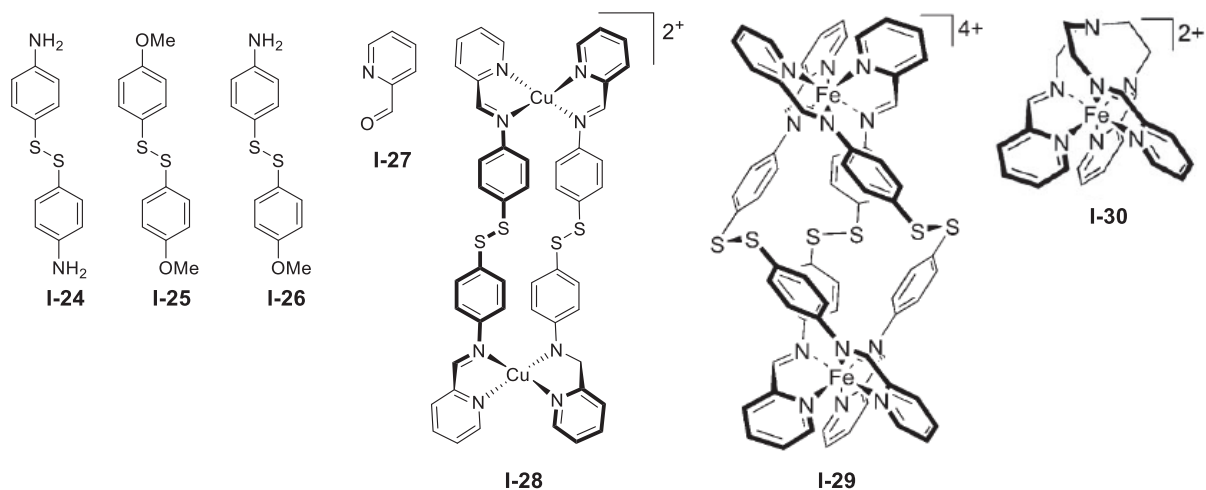


Figure 19 : Objets supramoléculaires formés par triple CCD.

Pour prouver le caractère dynamique des objets formés, divers tests ont été effectués. L'ajout d'un excès de fer a entraîné la formation du nouveau complexe **I-29** ou le métal se trouvait hexacoordiné. L'ajout de tris(2-aminoéthyl)amine sur un mélange contenant **I-29** et le disulfure **I-24** entraîna le relargage du disulfure **I-25** et la formation préférentielle du nouveau complexe **I-30**. De plus, un échange entre les ponts disulfures des homodimères **I-24** et **I-25** amena à la formation partielle de l'hétérodimère **I-26**. Grâce à ces diverses expériences, le caractère réversible de chacune des liaisons d'assemblage utilisées fut établi. Ces travaux étaient les premiers montrant la possibilité d'avoir un triple équilibre dynamique en solution, permettant la complexification des chimiothèques ainsi créées.

Plus récemment, des cages moléculaires s'auto-assemblant via la formation d'hydrazones et de ponts disulfures ont été développées par le groupe d'Ulrich.⁹⁸ Partant d'un tétraphényléthène portant 4 aldéhydes **I-31** et de l'hydrazide thioglycolique **I-32**, ils ont observé la formation unique et sélective de la cage moléculaire **I-34** résultant de l'assemblage de 10 composants via 12 liaisons réversibles (Figure 20).

Pour des raisons de solubilité, l'expérience a été réalisée dans un mélange DMSO/H₂O (94:6 v/v) et l'équilibre a été atteint en 3 jours. Supposant que l'oxydation des thiols était le facteur cinétique limitant, l'espèce **I-33** résultant de la dimérisation oxydante de **I-32** a été synthétisée. Le temps nécessaire à l'équilibration de **I-31** et **I-33** a été réduit à 24 h, validant l'hypothèse émise. Une augmentation de la concentration ou de la température a aussi accéléré la formation de la cage moléculaire **I-34**. Le suivi de l'émission en fluorescence durant le processus d'équilibration a montré un déplacement de 12 nm vers le bleu pendant la formation des cages moléculaires. Après avoir validé la viabilité de leur méthodologie sur des cages inertes, ils ont exploré l'échange de **I-32** par le dérivé de la cystéine **I-35** conduisant à la formation sélective d'une nouvelle cage moléculaire. Celle-ci peut être post-fonctionnalisée par le biais des huit fonctions amines.

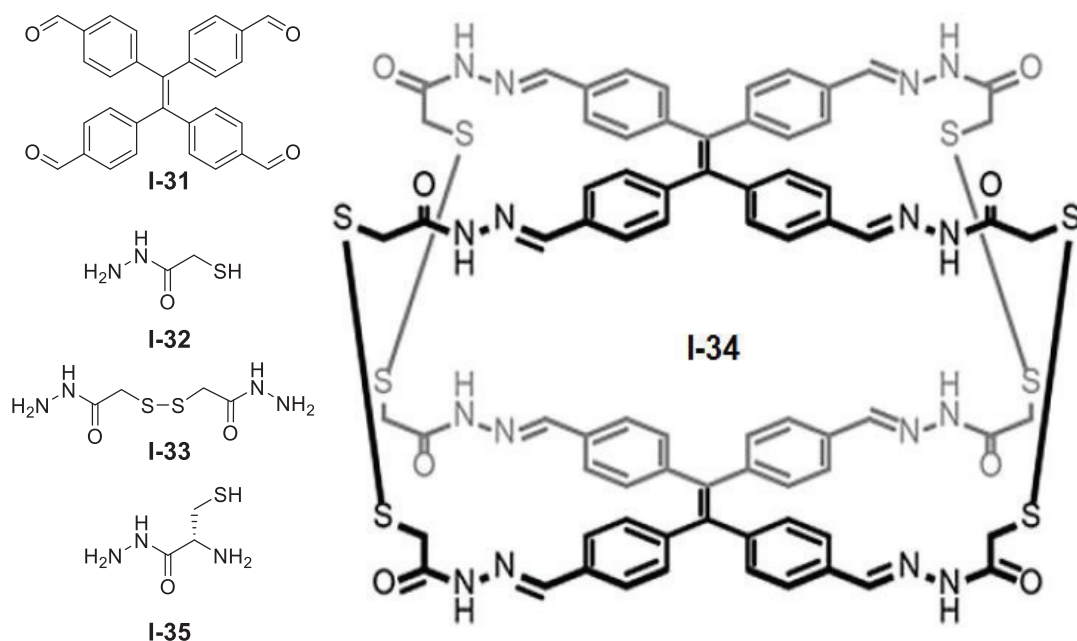


Figure 20 : Briques utilisées et cages moléculaires formées par double CCD

Ces deux exemples de chimie combinatoire dynamique alliant la formation de multiples équilibres dynamiques montrent la capacité de la CCD à se rapprocher de la chimie systémique, i.e. du fonctionnement de la nature où de multiples réactions chimiques ont lieu successivement ou simultanément pour générer sélectivement des espèces supramoléculaires.

I.4.4. La chimie combinatoire dynamique solide

L'apparition des broyeurs à billes durant la dernière décennie a permis d'étudier les réactions de chimie organique classique en absence ou avec de très faibles quantités de solvant. Le groupe de Sanders a été le premier à étudier ces réactions dans le contexte de la CCD. En 2011, la première équilibration de formation de ponts disulfures activée par mécanochimie est décrite.⁹⁹ Leurs travaux ont porté sur l'échange de disulfure. En partant d'un système simple composé de deux homodimères **I-36** et **I-37** broyés ensemble, les auteurs ont montré l'échange de ponts disulfures et la formation à 97% de l'hétérodimère **I-39** en présence d'une quantité catalytique de DBU (Figure 21).

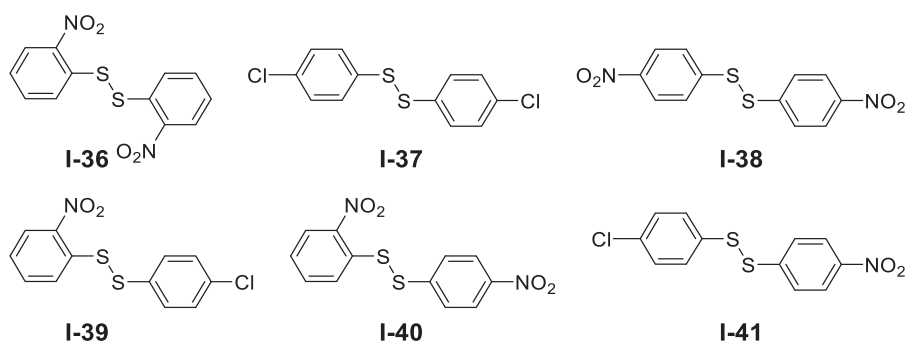


Figure 21 : Homodimères de départ **I-36**, **I-37**, **I-38** et hétérodimères **I-39**, **I-40**, **I-41** résultant de leur échange

Souhaitant vérifier que la réactivité observée correspondait bien à un équilibre thermodynamique, ils ont répété cette expérience avec un 3^{ème} disulfure **I-38**. En modifiant l'ordre d'introduction des réactifs (Première réaction entre **I-36** + **I-37** puis ajout de **I-38** vs **I-36** + **I-37** + **I-38**) et/ou les espèces en présence (hétérodimère ou homodimère), la même distribution finale a été obtenue, validant l'atteinte d'un équilibre thermodynamique (Figure 22).

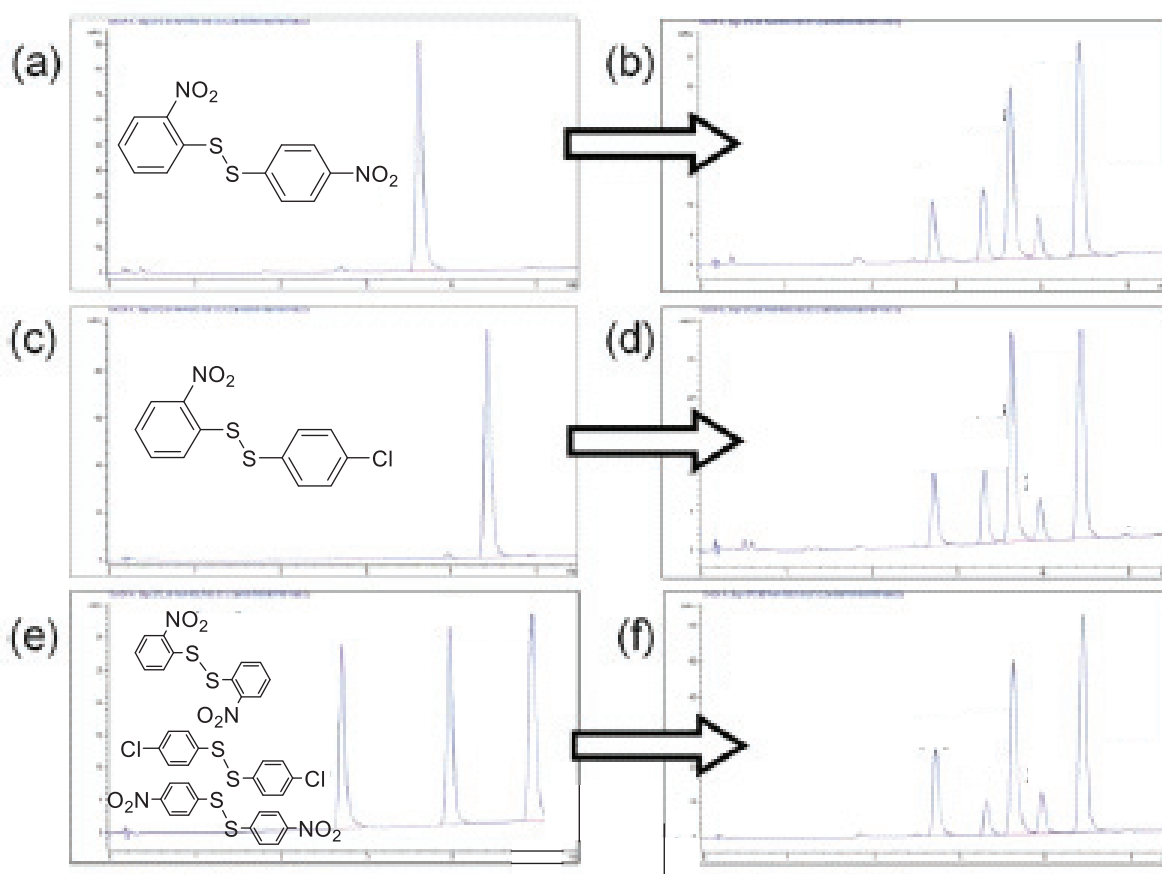


Figure 22 : Différents points de départ de la chimiothèque combinatoire dynamique amenant à la même distribution d'espèces à l'équilibre

I.4.5. Limitations de la chimie combinatoire dynamique

Bien que la chimie combinatoire dynamique soit en expansion depuis le début des années 2000 (Figure 23), de nombreux écueils subsistent encore. Dans cette partie, nous allons aborder les plus fréquemment rencontrés et les solutions mises en œuvre pour les solutionner.

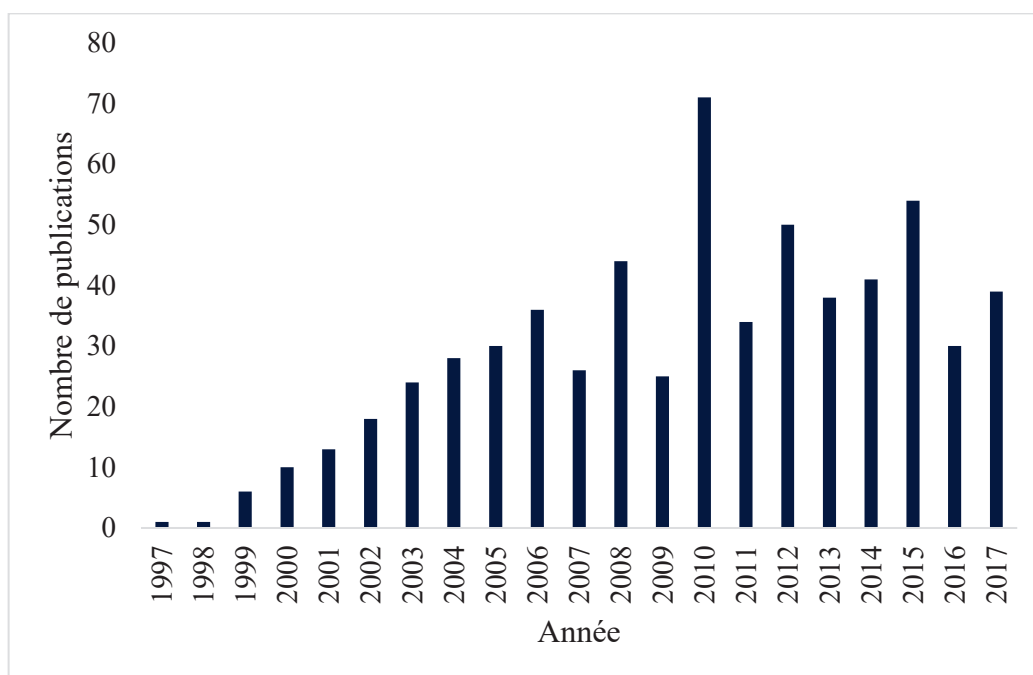


Figure 23 : Evolution du nombre de publication par an portant sur la chimie combinatoire dynamique en recherchant « dynamic combinatorial chemistry » sur SciFinder.

I.4.5.1. Non-compatibilité entre le stimulus et les conditions d'équilibration

Le problème le plus couramment rencontré concerne la non-compatibilité entre le template et les conditions opératoires d'équilibration. L'exemple le plus marquant est celui des biomolécules. Ces dernières, souvent des protéines, sont des macromolécules thermo- et pH-sensibles et doivent être utilisées en conditions douces pour éviter toute dégradation. Le plus souvent, cela implique un pH proche de la neutralité, une pression proche de l'atmosphérique et une température inférieure à 50°C.

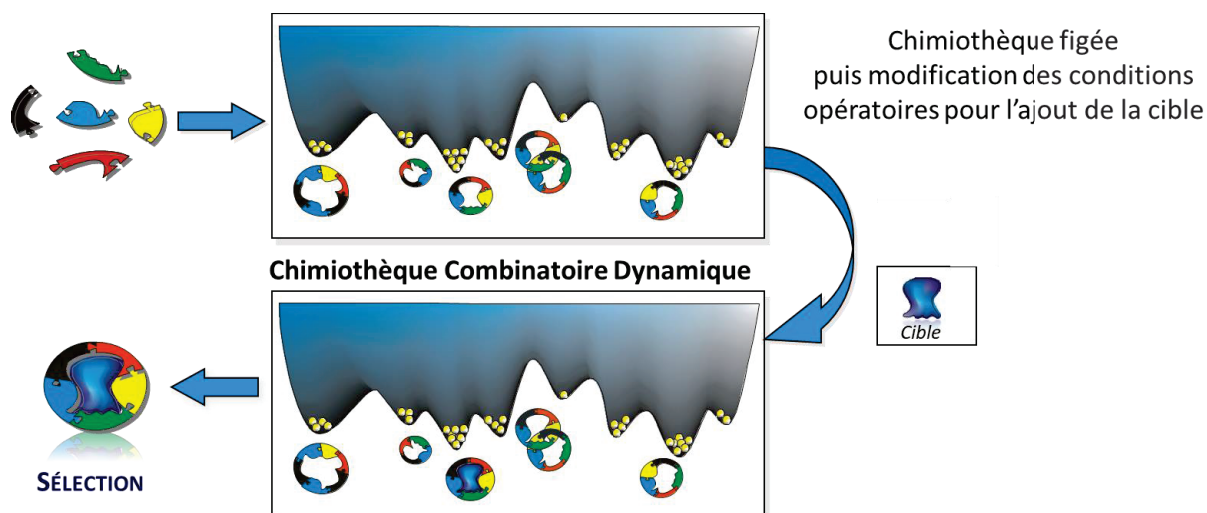


Figure 24 : Représentation schématique d'une expérience de CCD pré-équilibrée

Pour pallier à ce problème, le concept de chimiothèque combinatoire dynamique pré-équilibrée a été développé (Figure 24).⁸⁸ La pré-équilibration implique d'atteindre l'équilibre en absence du template. Puis les conditions réactionnelles sont modifiées pour permettre l'ajout de celui-ci. Aucune amplification n'a lieu dans ce type de chimiothèque, néanmoins un phénomène de sélection est présent. En effet, le template va reconnaître et se lier à ses ligands les plus affins. Les complexes ligand-template peuvent potentiellement être détectés par spectrométrie de masse ou par spectroscopie RMN. Pour obtenir une identification plus précise des meilleurs ligands, une étude par déconvolution ou par séparation des espèces liées au template (centrifugation puis relargage) sont classiquement employées.

Lehn *et coll* ont développé un processus par déconvolution pour l'identification d'inhibiteurs de l'acétylcholine estérase.¹⁰⁰ Cette enzyme, dont le rôle biologique est d'hydrolyser le neurotransmetteur cationique acétylcholine, possède une affinité pour divers groupements fonctionnels tels les carbamates, les phosphates et les ammoniums quaternaires. La formation réversible d'hydrazones a été choisie comme réaction réversible pour la connexion des fragments portant les groupements fonctionnels. Quatre hydrazides **I-42a-d** portant un groupement ammonium quaternaire, quatre monoaldéhydes **I-43a-c/I-27** et cinq dialdéhydes **I-44a-e** ont été placés en solution, générant potentiellement jusqu'à $(4 \times 4 + 5 \times 10) = 66$ espèces à l'équilibre (Schéma 8).

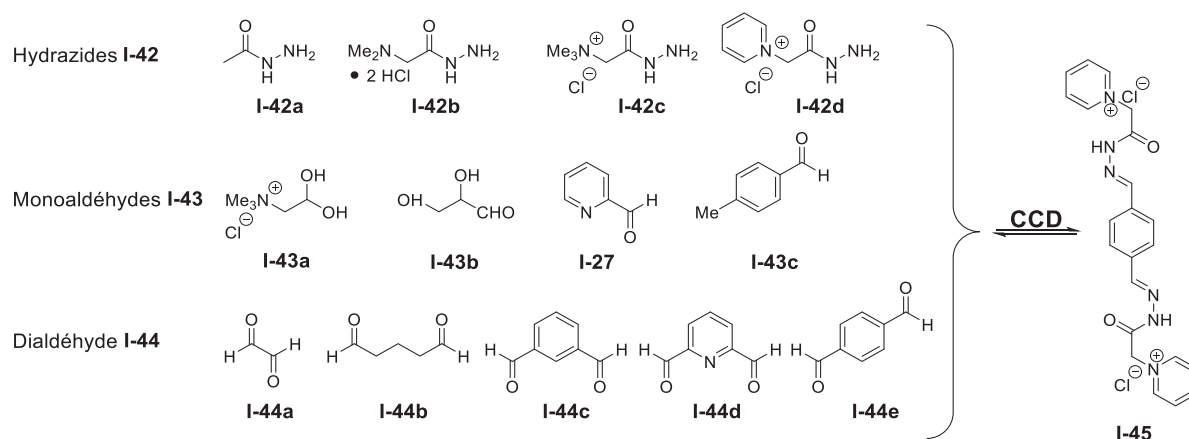


Schéma 8 : Briques aldéhydes et hydrazides de départ ainsi que le composé **I-45** identifié comme le plus actif.

La pré-équilibration a été menée à pH 4 puis la chimiothèque a été figée en augmentant le pH à 7.2 dans un tampon phosphate bloquant ainsi la réaction d'échange. L'activité inhibitrice vis à vis de l'enzyme a alors été évaluée et une activité détectée. La mise en place d'un processus de déconvolution a permis d'identifier les espèces actives. La génération de 13 sous-chimiothèques où une des briques moléculaires de départ était absente a permis d'identifier l'hydrazide **I-42d** et le dialdéhyde **I-44e** comme essentiels à l'activité. L'identification de l'espèce di-cationique **I-45** via déconvolution a été suivie de sa synthèse. Son IC_{50} a été établi à 2.3 nM ce qui en fait le meilleur inhibiteur bis-ammonium quaternaire de l'acétylcholine estérase.

Une variante de la CCD pré-équilibrée est l'utilisation itérative de chimiothèque combinatoire dynamique appelée CCD itérative.¹⁰¹ Dans cette approche, la chimiothèque est aussi pré-équilibrée en absence de template. Les oligomères à l'équilibre sont mis en présence du template et les molécules reconnues sont séparées des espèces non-actives via diverses méthodes telles la centrifugation du complexe ligand-template ou la séparation par une résine composée du template. La chimiothèque résultante, ne comprenant que les oligomères ne possédant pas d'affinité pour le template, est alors réactivée et un nouvel équilibre thermodynamique est atteint. Un nouveau cycle de reconnaissance moléculaire et d'isolement des molécules actives est alors effectué. Après plusieurs cycles, une amplification partielle des meilleurs ligands est obtenue et ces derniers peuvent alors être caractérisés.

En 1997, Eliseev *et al*¹⁰² publient la première utilisation de la CCD itérative. Leurs travaux ont porté sur l'isomérisation photochimique *cis,cis/cis,trans/trans,trans* (Schéma 9a) du dicarboxylate **I-46**. Dans un premier temps, les différents isomères sont soumis à une photo irradiation sous lumière UV induisant leur interconversion. Puis, la solution est passée sur un gel de silice où l'arginine a été immobilisée (Schéma 9b). L'espèce *cis,cis* étant la plus affine pour l'arginine, elle va rester sur le gel de silice et seules les espèces *cis,trans* et *trans,trans* retourneront dans la chambre d'isomérisation. Après 30 cycles, un nouvel équilibre est atteint, très différent de celui initial. Les ratios *cis,cis/cis,trans/trans,trans* sont passés de 3/28/69 à 48/29/23 pour les espèces non liées. Pour les molécules fixées sur la colonne de silice, le ratio est 85/13/2. Ainsi, via cette expérience Eliseev *et al* ont montré la possibilité de sélectionner le meilleur ligand pour l'arginine mais aussi de l'amplifier de manière spectaculaire en séparant les processus d'équilibration et de sélection.

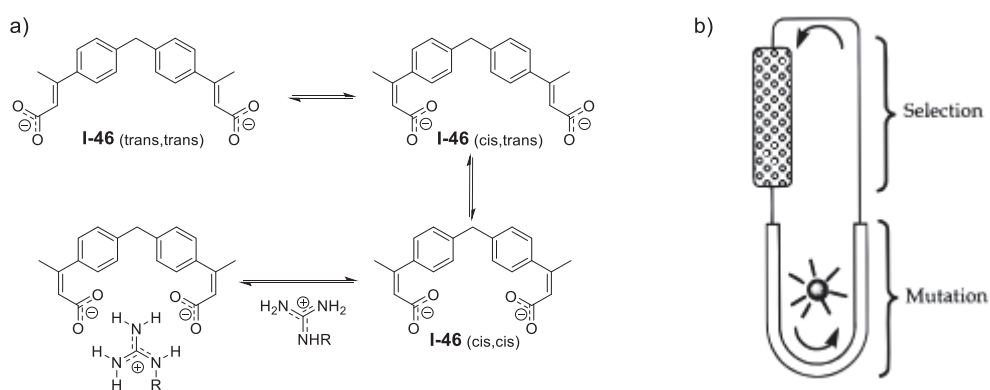


Schéma 9 : a) Evolution des espèces du dicarboxylate **I-46** sous excitation UV. b) Représentation schématique du montage utilisé.

I.4.5.2. Difficultés d'identification des meilleurs ligands pour les grandes chimiothèques

Un deuxième problème rencontré par la chimie combinatoire dynamique est celui de l'identification des meilleurs ligands lorsque le nombre d'espèces en équilibre est important. En effet, la majorité des exemples existant dans la littérature concerne des chimiothèques de taille modeste (<100 espèces) pour lesquelles les techniques classiques d'analyses (RMN/HPLC-MS) parviennent à identifier les espèces actives. Néanmoins, lorsque des

centaines voire des milliers de composés sont générés, la question de la détection du meilleur ligand se pose.

Le groupe de Sanders a cherché à répondre à cette question.¹⁰³ Un modèle mathématique avait déjà été développé par Moore et Zimmerman mais il ne prédisait pas la concentration du meilleur ligand dans une chimiothèque possédant un nombre d'espèces fini.¹⁰⁴ Sanders *et coll* ont considéré que chaque oligomère formé dans la chimiothèque était unique et possédait une constante d'association au template propre. La distribution des constantes d'association fut générée en suivant une loi uniforme continue et elles furent attribuées aléatoirement aux divers oligomères. En absence de template, tous les composés sont capables de s'interconvertir et la concentration de chaque oligomère est uniforme. Lorsque le template est ajouté, la distribution d'espèce varie en fonction des constantes d'association. Les résultats obtenus dans ce cas idéal semblent propices à l'identification des meilleurs ligands, même dans une chimiothèque comportant plusieurs milliers de composés (Figure 25). Pour une chimiothèque de 10 000 composés, le meilleur ligand aura en moyenne une concentration de 8% après ajout du template et rééquilibration soit un facteur d'amplification de 800. A 100 000 composés, cette dernière n'est plus que de 2% (facteur d'amplification de 2000) mais cela reste suffisant pour obtenir les informations nécessaires à sa caractérisation.

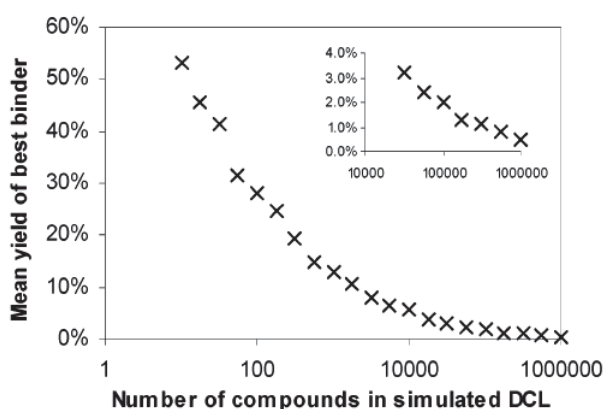


Figure 25 : Rendement maximum de l'espèce la plus amplifiée dans une chimiothèque combinatoire dynamique en fonction du nombre de composés formés.

I.4.5.3. Amplification du meilleur ligand

Une autre limitation concerne le phénomène d'amplification qui permet *a priori* de détecter les espèces ayant les plus fortes affinités pour le template en solution. De prime abord, il semble logique de conclure que la molécule ayant la plus forte affinité pour le template sera la plus amplifiée. Néanmoins, ce raisonnement ne tient pas compte du fait que le système minimise l'énergie libre non pas d'un complexe mais de la chimiothèque entière.

Les premiers à étudier cette problématique ont été les groupes de Severin et Sanders. En 2003, Severin *et coll* publient un premier article combinant modélisation théorique et expérimentations, révélant que la plus grande amplification ne concerne pas forcément l'adduit le plus stable.¹⁰⁵

Leur modèle théorique repose sur un système de 3 briques moléculaires **A**, **B** et **C** en quantité équimolaire en solution. La chimiothèque générée virtuellement se limite aux macrocycles à 3 unités, ce qui correspond à 10 espèces en solution (Tableau 4).

Tableau 4 : Simulation des concentrations relatives à l'équilibre des macrocycles de taille 3 issues des briques moléculaires A, B et C en fonction de leur stabilité relative.

Entry	Relative stability relative concentration [%]									
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3.7	11.1	11.1	3.7	11.1	11.1	3.7	11.1	11.1	22.2
2	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	28.1	0.5	3.4	7.2	21.5	21.5	7.2	0.5	3.4	6.8
3	1	1000	1	1	1	1	1	1	1	1
	0.0	47.7	0.5	1.9	11.1	21.2	13.5	0.1	1.9	2.0
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1000
	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	99.6
5	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1000
	0.4	0.0	0.1	0.1	0.3	0.3	0.1	0.0	0.1	98.6
6	900	600	300	1	1	1	1	600	300	300
	0.1	2.1	22.8	0.5	1.6	1.6	0.5	2.1	22.8	45.7

En absence d'effet template, la distribution statistique des espèces obtenue correspond à la stabilité relative des espèces attribuée selon le modèle théorique, (Entrée 1). Lorsqu'un seul macrocycle est sur-stabilisé par un facteur 1000 (Entrées 2-4), Un déplacement de l'équilibre favorisant sa formation est observé. Il est intéressant de noter que lorsque le même un facteur de stabilisation est appliqué à divers macrocycles, leurs concentrations relatives varient fortement et dépendent de leur nature homo- ou hétérooligomérique. Plus perturbant est le cas où deux espèces sont sur-stabilisées (Entrée 5). Lorsque l'homooligomère **AAA** et l'hétérooligomère **ABC** possèdent tous les deux une stabilité relative 1000 fois supérieure aux autres espèces, la chimiothèque générée se compose ultra-majoritairement du trimère **ABC** (98.6%). Une diminution de la concentration de l'homooligomère **AAA** par rapport à la chimiothèque de référence est même observée (3.7→0.4%). Le dernier cas proposé par Severin *et coll* correspond à un cas plus proche de la réalité ou un des monomères de départ est sur-stabilisé par rapport aux autres (Stabilité intrinsèque, entrée 6). Chaque unité de **A** incluse dans un macrocycle apporte une sur-stabilisation par un facteur 300. Ainsi, les affinités entre les différents macrocycles se classent dans l'ordre suivant :

AAA (900) > **AAB**, **AAC** (600) > **ABC**, **ABB**, **ACC** (300) > **BBB**, **BBC**, **BCC**, **CCC** (1).

Toutefois, la distribution d'espèce obtenue est la suivante :

ABC (300) > **ACC**, **ABB** (300) > **AAC**, **AAB** (600) > **BBC**, **BCC** > **BBB**, **CCC** (1) > **AAA** (900)

Une fois de plus, l'espèce la plus stabilisée n'est pas la plus amplifiée et dans ce cas précis, elle est même la moins représentée.

Pour illustrer la pertinence de ce modèle théorique, Severin *et coll* ont construit une chimiothèque combinatoire dynamique fondée sur des complexes de ruthénium (Schéma 10). La synthèse de trois complexes trimériques homoleptiques **aaa**, **bbb** et **ccc** avec **aaa** étant le plus stable leur a permis de générer une chimiothèque combinatoire dynamique. Comme prévu

par leur modèle mathématique, les espèces dominantes à l'équilibre sont les complexes hétéroleptiques **abc**, **abb** et **acc**. Les résultats expérimentaux obtenus ou le complexe le plus affin **aaa** n'est même pas observé valident leur modèle théorique. Ceci démontre aussi la puissance du biais vers la formation d'hétérooligomères pouvant aller jusqu'à la disparition des homooligomères pourtant les plus stables.

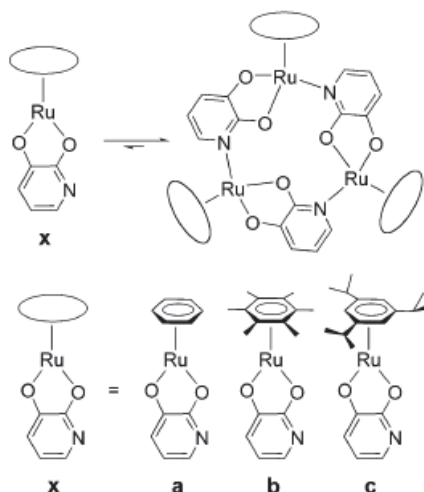


Schéma 10 : Synthèse de divers complexes de ruthénium par chimie combinatoire dynamique, **aaa** étant le plus stable.

Dans l'étude de cas menée par Severin, l'influence de la concentration du template n'est pas examinée. A partir de précédents travaux, le groupe de Sanders a corrélié modèle mathématique et résultats expérimentaux pour mettre en évidence l'importance de cette concentration.¹⁰⁶ Dans leur précédente étude, Sanders *et coll* avaient synthétisé des briques moléculaires dithiolées dans le but de générer les analogues disulfures des récepteurs à ammonium de Dougherty.^{89,107,108} Les résultats obtenus se distinguaient de ceux de Dougherty *et coll*, les meilleurs récepteurs n'étant pas les équivalents dynamiques de ceux décrits par Dougherty mais les espèces **I-50**, **I-51** et **I-52** (Schéma 11).

Les données thermodynamiques obtenues ont révélé des constantes d'affinité croissante des macrocycles K_a (**I-51**) < K_a (**I-50**) < K_a (**I-52**) pour l'ammonium **I-49**. Un modèle théorique ne prenant en compte que ces 3 oligomères cycliques a pu être développé et leurs amplifications relatives induites par une concentration variable de **I-49** ont pu être déterminées (Figure 26a). L'homotétramère **I-52** ne représentant au maximum que 0.6% de la chimiothèque, ses amplifications relatives n'ont pas été incluses dans les graphes présentés. Lorsque la concentration du template **I-49** est faible, le facteur d'amplification est en accord avec l'affinité relative des macrocycles. Ainsi, **I-50** est plus amplifié que **I-51**. Toutefois, au-delà d'une concentration limite en template, la formation de l'hétérotrimère **I-51** est favorisée. Plusieurs expérimentations ont été menées et la courbe d'étalonnage (Figure 26b) obtenue est en accord avec le modèle théorique. Une fois de plus, ces résultats montrent la dissociation entre amplification et constante d'association.

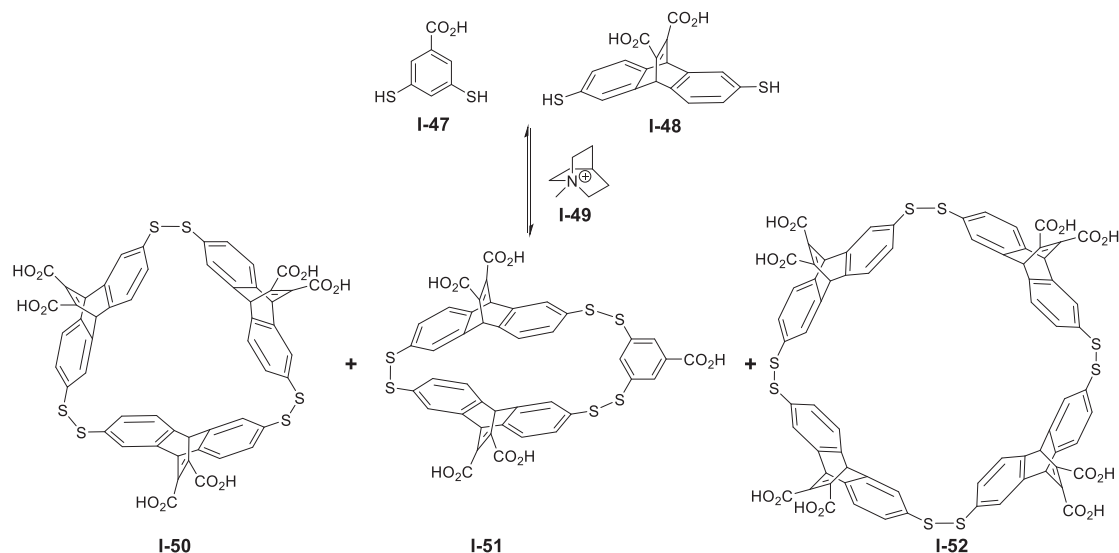


Schéma 11 : Macrocycles issus de l'équilibration de **I-47** et **I-48** en présence de l'ammonium **I-49**.

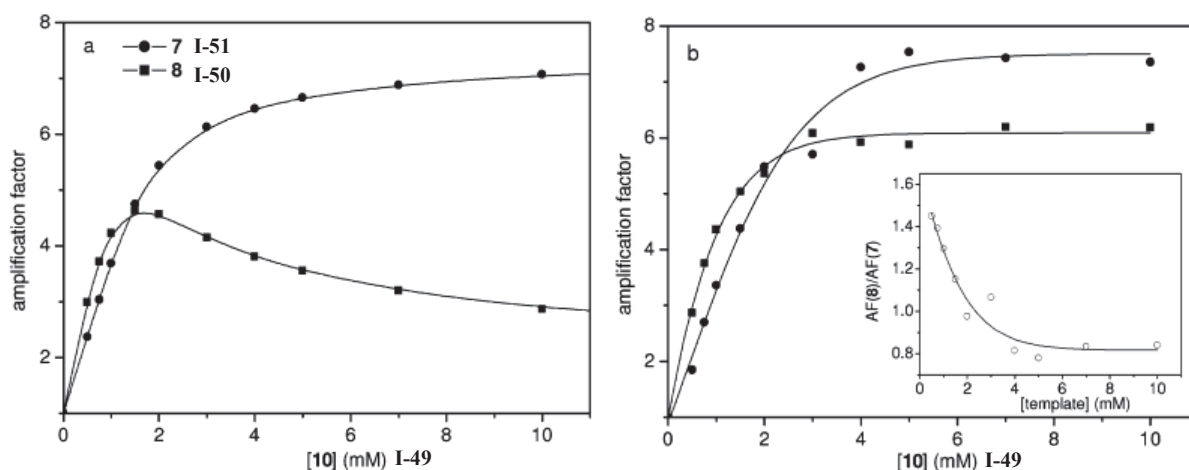


Figure 26 : a) Evolution théorique des amplifications de l'homotrimère **I-50** et de l'hétérotrimère **I-51** en fonction de la concentration de l'ammonium **I-49**. b) Résultats expérimentaux des amplifications de **I-50** et **I-51** en fonction de la concentration de l'ammonium **I-49**.

De ces travaux, Sanders et Severin proposent quelques solutions pour éviter un biais de la chimiothèque combinatoire dynamique. La première, directement tirée de leurs analyses vise à diminuer la concentration du template pour favoriser la sélection et l'amplification du meilleur ligand. La deuxième consiste à déplacer l'équilibre vers les synthons de départ. Ainsi, la chimiothèque tendra à former uniquement les oligomères les plus affins. Une troisième solution consiste en l'isolement des ligands du template. S'il est possible de séparer les espèces liées des composés en solution, l'étude des premières permet d'avoir un reflet bien plus proche des affinités réelles. Enfin, il est conseillé de faire varier les proportions des différentes briques moléculaires de départ pour éviter la formation statistique d'hétéro-oligomères.

I.4.5.4. Isoénergicité des liaisons

Malgré une réversibilité totale de la réaction, la plupart des cas impliquant deux fonctions réactives sur une brique moléculaire de départ amènent à la formation préférentielle de

macrocycles. Ces derniers agissent comme des puits thermodynamiques pour des raisons entropiques et limitent la formation de longues chaînes oligomériques.⁸⁷ Il a été démontré que la formation d'oligomères linéaires ne pouvait se produire que lorsque la concentration impliquait que $k_{\text{inter}} > k_{\text{intra}}$.

Lorsque cela est possible, il est conseillé d'utiliser des briques moléculaires rigides rendant la cyclisation des espèces plus difficile et favorisant le k_{inter} .

Malheureusement, aucune véritable solution à l'exception de modifier la brique moléculaire de départ n'existe à l'heure actuelle pour lutter contre la réaction de cyclisation intramoléculaire. La seule possibilité est de concentrer l'échantillon mais la limite de solubilité reste une propriété intrinsèque de la molécule.

I.4.5.5. Vérifier l'atteinte de l'équilibre

L'aspect le plus important de la chimie combinatoire dynamique est le caractère thermodynamique du système étudié. L'atteinte de l'équilibre est primordiale et diverses méthodes ont été développées pour le vérifier. La plus classiquement utilisée consiste à partir de deux points de départ différents et de montrer que la distribution des espèces à l'équilibre est conservée. La variation d'un paramètre tel le pH, la température ou la pression entraînant une modification des espèces en présence peut être une voie alternative ; le retour aux conditions initiales devant rétablir le premier équilibre observé. Similairement, le déplacement de l'équilibre via l'addition puis soustraction d'un template est une autre méthode pour vérifier la réversibilité totale du système. Enfin, l'isolement d'un composé connu de la chimiothèque puis la rééquilibration de celui-ci en présence des briques moléculaires manquantes doit conduire au même résultat.⁸⁷

I.4.6. Les réactions réversibles compatibles avec les protéines

Parmi les nombreuses réactions atteignant un équilibre thermodynamique, seules quelques-unes peuvent être appliquées pour l'étude d'interactions avec des protéines.¹⁰⁹ En effet, la biocompatibilité des réactions et des espèces formées est nécessaire pour générer une chimiothèque combinatoire dynamique en présence de protéine. De plus, la réaction doit être chimiosélective pour éviter toute réaction croisée avec un autre groupement fonctionnel des synthons de départ ou de la protéine (Schéma 12).

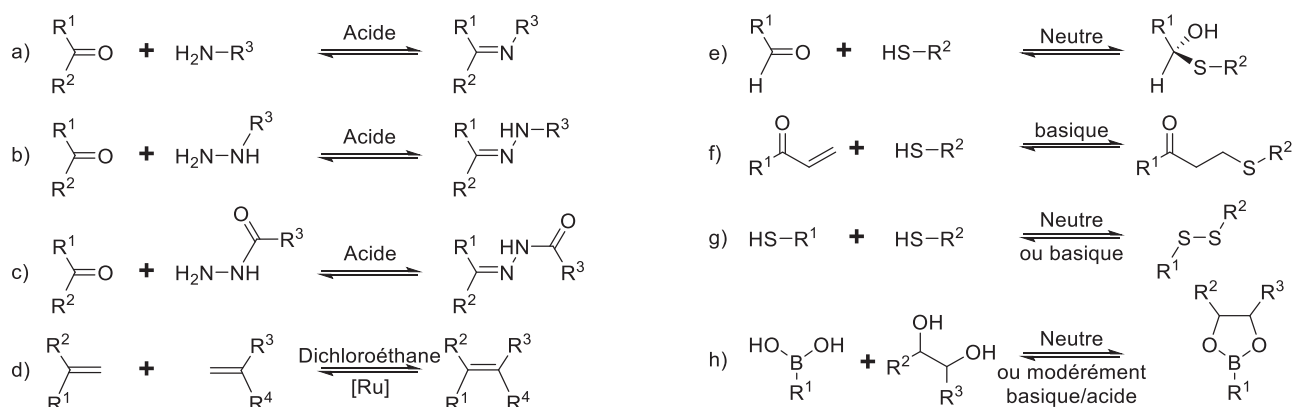


Schéma 12 : Réactions réversibles utilisées en CCD avec des protéines.

Il est important de noter que certaines réactions nécessitent des chimiothèques combinatoires dynamiques pré-équilibrées tandis que d'autres sont équilibrées en présence de la protéine. Dans le premier cas, seul un phénomène de sélection est observé quand des amplifications sont déterminées dans le deuxième. Parmi toutes les réactions disponibles en CCD, la formation d'hydrazones ou d'acylhydrazones et de disulfures ont été particulièrement valorisées pour leur simplicité de mise en œuvre et d'analyse ainsi que la disponibilité des briques moléculaires de départ.

Dans la partie suivante, nous allons développer les résultats obtenus avec ces deux types de réactions réversible utilisées pour générer des partenaires moléculaires de molécules bioactives.

I.4.6.1. Hydrazones/Acylhydrazones

I.4.6.1.1 Hydrazones

Bien que le terme de CCD ne puisse être appliqué, les travaux de Rideout posent les bases de l'utilisation d'hydrazones comme molécules actives biologiquement et capables de s'auto-assembler.¹¹⁰ Partant du décanal et de la *N*-amino-*N'*-1-octylguanidine, il démontre leur absence d'activité cytotoxique sur les érythrocytes humains. Toutefois, lorsque les deux molécules sont incubées ensemble en présence d'hématies, la lyse des cellules est observée en 80 minutes. La présence de l'hydrazone en solution a été démontrée par CCM et Rideout attribua l'activité biologique à la formation *in situ* de cette dernière. Via ces travaux, Rideout introduit le concept de formation *in situ* d'hydrazone en présence d'une molécule cible pour parvenir à une activité biologique. La réaction étant réversible, elle sera reprise en CCD par les groupes de Lehn et Sanders à la fin des années 90^{86,111} devenant ainsi les premiers exemples de chimiothèques combinatoires dynamiques d'hydrazones.

La formation d'hydrazones n'est que peu compatible avec les molécules biologiques. En effet, pour obtenir une cinétique d'équilibration rapide, il est nécessaire de travailler à pH faible (1) ou à haute température ce qui entraîne la dégradation de la plupart des cibles biologiques.¹¹² En revanche, les hydrazones formées sont stables à pH neutre, ce qui permet la génération d'une chimiothèque combinatoire dynamique pré-équilibrée suivie d'un phénomène de sélection par une biomolécule. Nguyen et Huc ont cherché à optimiser la réversibilité de la réaction dans des conditions physiologiques. Pour cela, ils ont synthétisé diverses hydrazines portant un groupement électroattracteur en *alpha*.

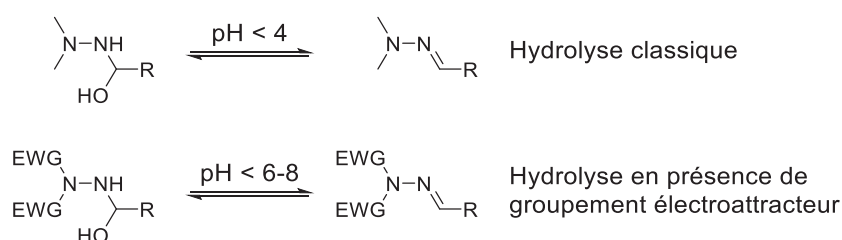


Schéma 13 : Optimisation de l'hydrolyse des hydrazones

Leur étude démontre la capacité des hydrazones formées à s'hydrolyser dans une gamme de pH comprise entre 6 et 8 permettant l'accès à l'équilibre thermodynamique en quelques minutes dans des conditions physiologiques (Schéma 13).

La première application d'une chimiothèque combinatoire dynamique composée d'hydrazones vis-à-vis d'une protéine revient au groupe de Lehn avec leurs travaux sur l'acétylcholine estérase (Cf Chapitre 1, I.4.5.1).¹⁰⁰ Ayant déjà présenté ces travaux, nous nous intéresserons à des exemples plus récents.

En 2012, Wanner et Sindelar utilisent les hydrazones dans des conditions physiologiques pour l'identification d'inhibiteurs d'acide γ -aminobutyrique (GABA) transporteur (GAT1).¹¹³ En s'inspirant de trois inhibiteurs de GAT1 déjà connus, ils ont sélectionné une hydrazine (**I-53**) et 36 aldéhydes. Neuf chimiothèques combinatoires dynamiques composées de l'hydrazine **I-53** en excès (100 μ M) et 4 aldéhydes (10 μ M) ont été équilibrées à pH 7.1, 37°C et pendant 4 h en présence de la protéine pour obtenir une chimiothèque pseudostatique (Schéma 14a). Le terme pseudostatique est utilisé pour formaliser le fait que l'excès d'un composé de départ pousse l'équilibre vers la formation totale des produits d'équilibration (ici les hydrazones). Une étude par ligation compétitive analysée par spectrométrie de masse avec le ligand compétiteur NO711 (Schéma 14b) a permis de vérifier la présence d'inhibiteurs. Des tests par déconvolution pour les chimiothèques donnant les meilleures inhibitions ont permis d'identifier deux hydrazones, **I-54** et **I-55**, comme des ligands très affins (Schéma 14a) et 3 autres molécules possédant une plus faible affinité. La synthèse classique de **I-54** et **I-55** ainsi que des 3 autres composés a été entreprise et les résultats déterminés par CCD ont été validés via la mesure des constantes d'inhibitions et d'IC₅₀. En effet, **I-54** et **I-55** se sont révélés les meilleurs inhibiteurs parmi les molécules testées.

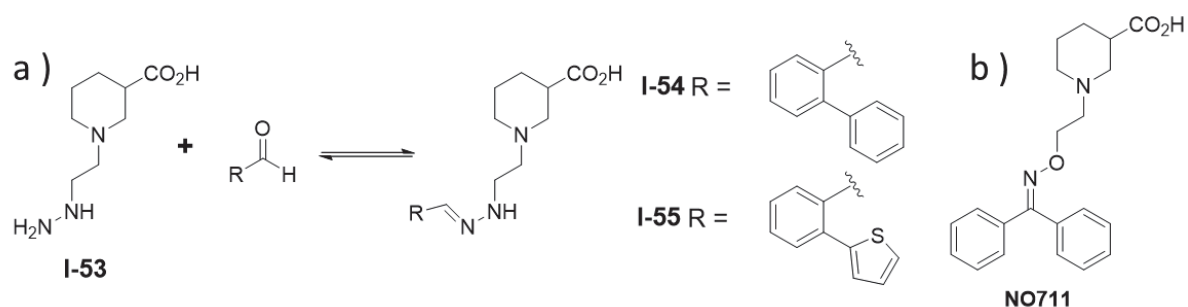


Schéma 14 : a) Chimiothèque combinatoire dynamique de **I-53** en présence d'aldéhydes ainsi que les espèces **I-54** et **I-55** identifiées comme actives. b) NO711 : Inhibiteur de GABA et GAT-1.

I.4.6.1.2 Acylhydrazones

La formation réversible d'acylhydrazone en CCD est une des premières réactions à avoir été étudiée. Toutefois, son application aux biomolécules est longtemps restée problématique. En effet, les travaux fondateurs de Sanders ont montré la nécessité d'un catalyseur acide (acide trifluoroacétique) pour obtenir une cinétique d'équilibration compatible avec la CCD.¹¹⁴ Depuis, il a été établi qu'un pH inférieur à 4 était nécessaire pour favoriser l'échange hydrazides/acylhydrazones.

En 2010, une solution pour utiliser des conditions biocompatibles fut apportée par le groupe de Greaney.¹¹⁵ Les isoenzymes sjGST et hGST P1-1 faisant toutes les deux parties de la classe d'enzyme glutathion S-transférase (GST) formèrent leurs cibles biologiques. Dix hydrazides (**I-57a-j**) et un aldéhyde (**I-56**) furent sélectionnés (Schéma 15a) pour générer une chimiothèque combinatoire dynamique. A pH 6.2 dans un tampon acétate d'ammonium, sept jours furent nécessaires pour atteindre l'équilibre. Toutefois, l'ajout d'un excès d'aniline jouant le rôle de catalyseur nucléophile permit de réduire le temps d'équilibration à 6 h. Après avoir validé la réversibilité de la réaction via deux méthodes : une composition de départ différente et l'excès d'un des hydrazides, une étude en présence des isoenzymes fut menée. En premier lieu, la non-influence de l'aniline sur l'activité de la protéine fut vérifiée. Puis, deux chimiothèques combinatoires dynamiques en présence de sjGST ou hGST P1-1 montrèrent respectivement l'amplification des acylhydrazones **I-58g** et **I-58c** (Schéma 15b). Néanmoins, leurs IC₅₀ ne purent être déterminés dû à la faible solubilité des deux molécules. Pour circonvier à ce problème, le GSH fut couplé à l'aldéhyde de départ. De nouvelles chimiothèques combinatoires dynamiques permirent d'établir l'amplification des deux hydrazones **I-59c** et **I-59g** issues des deux mêmes hydrazides (Schéma 15b). Cette fois-ci, leur solubilité permit de mesurer par spectrophotométrie UV leurs IC₅₀, établies à 22 µM pour **I-59c** sur sjGST et 57 µM pour **I-59g** sur hGST P1-1. Par comparaison avec l'aldéhyde de départ fonctionnalisé par le glutathion, cela correspond à une augmentation de l'inhibition d'un facteur 6 pour **I-59g** et d'un facteur 10 pour **I-59c**.

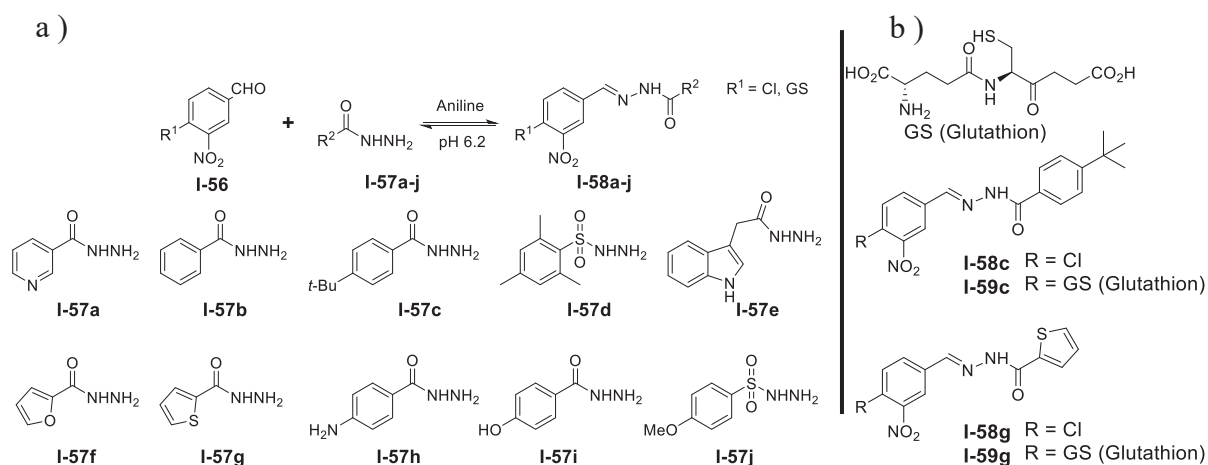


Schéma 15 : a) Conditions réactionnelles de la chimiothèque entre **I-56** et **I-57a-j**. b) Molécules actives contre sjGST et hGST P1-1.

En 2016, la première combinaison de la CCD et de la « fragment linking » est proposée par le groupe de Hirsch.¹¹⁶ Leur étude a porté sur l'inhibition de la protéase aspartique endothiapespine. Cette enzyme hydrolyse des substrats peptidiques en activant l'attaque nucléophile de la molécule d'eau. Fondée sur de précédents résultats¹¹⁷ décrivant la découverte de deux inhibiteurs (**I-60** / **I-61**) de la protéase issus de la conjugaison de la CCD et de la conception de médicament basée sur la structure (SBDD), une étude par modélisation moléculaire leur a permis de déterminer neuf bis-acylhydrazones construites sur un noyau

isophthalaldéhyde (**I-62**) permettant aux molécules formées de joindre simultanément plusieurs poches du site actif de l'enzyme (Schéma 16).

Après la synthèse des hydrazides correspondants, deux chimiothèques combinatoires dynamiques consistant en 4 ou 5 hydrazides mis en présence de l'isophthalaldéhyde **I-62** furent équilibrées à pH 4.6 en présence d'aniline. Toutes les espèces homo- et hétéro-bis-acylhydrazones furent observées et quantifiées en solution par HPLC-MS. Les chimiothèques furent répétées en présence de l'enzyme et une amplification de 4 espèces fut obtenue. La répétition de la chimiothèque en mélangeant cette fois les 9 hydrazides en présence du bis-aldéhyde révéla deux bis-acylhydrazones actives supplémentaires. Sur les 6 molécules identifiées comme possédant une affinité pour l'enzyme, deux étaient les homo-bis-acylhydrazones **I-66** et **I-67** (Schéma 16). Après synthèse, leur IC_{50} fut mesuré par fluorescence et comparé à celui des deux inhibiteurs précédemment identifiés. Une amplification par un facteur 240 de l'activité du composé **I-66** fut relevée par rapport au composé de référence **I-60**, validant ainsi la stratégie d'employer de façon concomitante la CCD et la fragment linking.

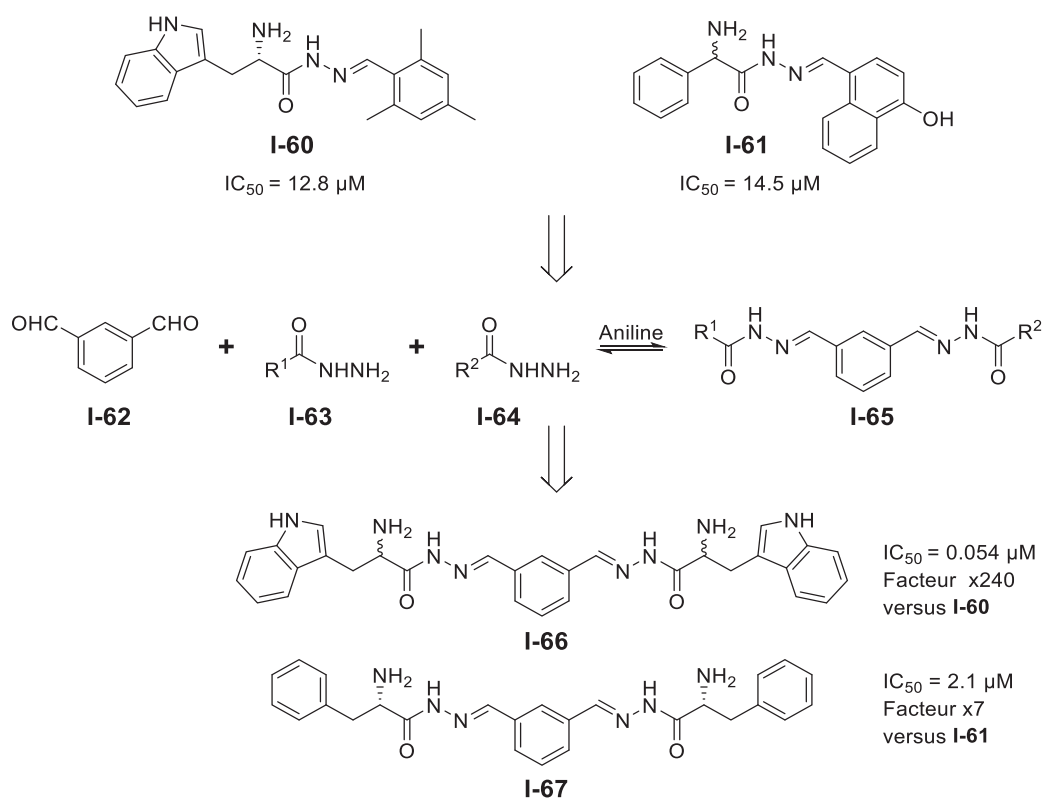


Schéma 16 : Conditions d'équilibration de la chimiothèque et inhibiteurs découverts via CCD

Ernst *et coll*¹¹⁸ ont récemment développé une méthodologie permettant de s'affranchir de la plupart des problèmes inhérents à la CCD en présence de protéine à savoir la séparation des espèces sélectionnées de la protéine. Il s'agit en effet de s'assurer que l'équilibre n'est pas altéré lors de la dénaturation de la protéine dissociant le complexe et que toutes les espèces liées sont bien relarguées dans le milieu.

Le modèle développé visait l'adhésine FimH, une lectine monovalente d'*Escherichia coli* ayant une affinité pour le mannose. Leur objectif étant uniquement de valider leur modèle, une

chimiothèque restreinte a été construite à partir de deux aldéhydes portant soit un mannose **I-68**, soit un glucose **I-69** et 4 hydrazides **I-70a-d** (Schéma 17).

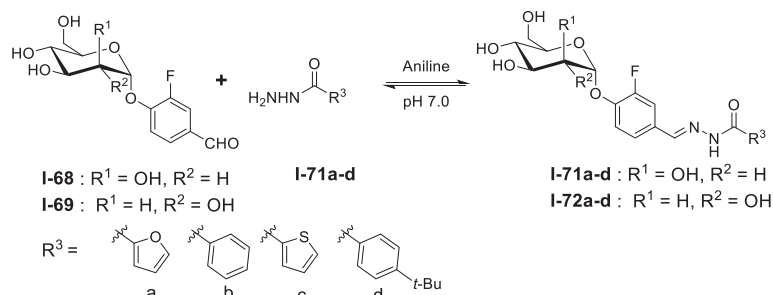


Schéma 17 : Briques moléculaires **I-68**, **I-69**, **I-70a-d** utilisées pour générer une chimiothèque d'acylhydrazones visant FimH.

Leur processus se déroule en 6 étapes (Schéma 18). En premier lieu, l'équilibration des divers composés a lieu à pH 7 en présence d'aniline et d'une FimH modifiée portant une biotine. A la fin de l'équilibration, le pH est augmenté à 8.5 figeant ainsi la chimiothèque. Un ligand compétiteur, le α -D-mannopyranoside de *n*-heptyle est alors ajouté en large excès, permettant l'expulsion dans le milieu des oligomères liés. Suite à cela, des billes streptavidine-agarose sont ajoutées au milieu, se liant instantanément à la biotine et donc à FimH. Le pH est alors augmenté à 12 pour s'assurer du relargage de toutes les molécules présentes dans le site de liaison. Enfin, une centrifugation du complexe agarose-FimH permet de précipiter ce dernier et de pouvoir analyser le surnageant où se trouvent toutes les espèces issues de l'équilibration. Le même processus est réalisé en absence de FimH pour obtenir une chimiothèque de référence. Les différences d'intégration entre les deux HPLC permirent d'établir les amplifications relatives des acylhydrazones **I-71a-d** et **I-72a-d**.

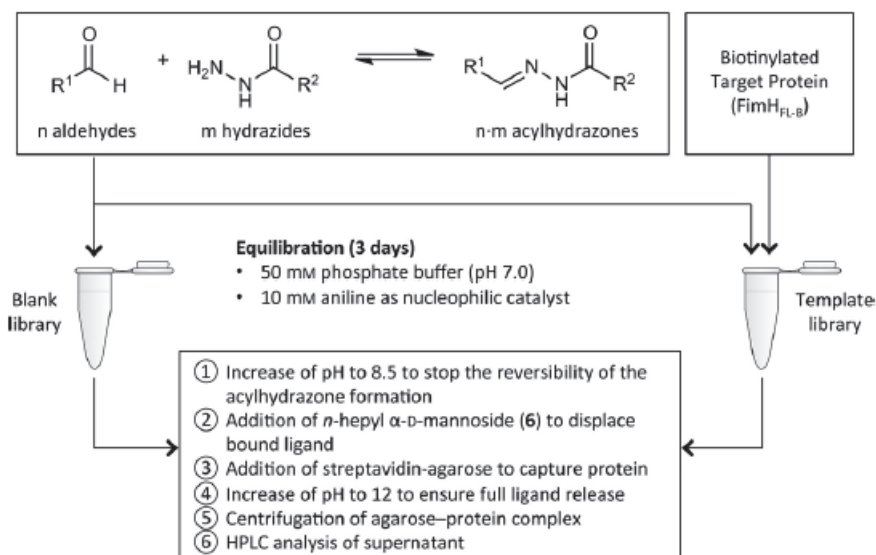


Schéma 18 : Mode opératoire pour relarguer les espèces liées.

Lorsque les 2 aldéhydes (**I-68** / **I-69**) et 4 hydrazides (**I-70a-d**) furent mélangés de façon équimolaire (200 μM chacun), une amplification du composé **I-71c** et une diminution du composé **I-71d** furent observées, les composés **I-71a** et **I-71b** ne variant pas. Aucune variation

significative ne fut obtenue pour les acylhydrazones (**I-72a-d**) issues de la brique aldéhyde portant le glucose. Expliquant cela par l'excès d'hydrazides par rapport aux aldéhydes, une deuxième expérience fut mise en place avec des concentrations de 200 μ M pour les aldéhydes et 50 μ M pour les hydrazides. Cette fois-ci, toutes les espèces possédant un groupement mannose furent amplifiées en respectant les affinités précédemment observées (**I-71c** > **I-71a**, **I-71b** > **I-71d**) tandis que celles comportant un glucose décruent.

Cette méthode d'analyse peut *a priori* être étendue à d'autres protéines et d'autres types de liaisons réversibles et permet d'éviter tout doute sur la distribution d'espèces de la chimiothèque à l'équilibre.

Ces exemples d'utilisation d'hydrazones et d'acylhydrazones en présence de protéines démontrent la compatibilité de ce type de liaison avec les biomolécules. Toutefois, les conditions nécessaires à une équilibration rapide des chimiothèques combinatoires dynamiques requièrent des modalités particulières. Dans le cas des hydrazones, la trop grande stabilité de ces dernières pose des soucis quant à leur utilisation en CCD et les hydrazines de départ doivent être choisies minutieusement. Pour les acylhydrazones, l'ajout d'aniline comme catalyseur nucléophile de leur formation est nécessaire pour travailler à des pH proches du physiologique.

I.4.6.2. Les disulfures

I.4.6.2.1. La liaison disulfure

La liaison disulfure est certainement la plus étudiée en présence de biomolécules pour ses nombreux avantages. Présente comme processus biologique dans le repliement des protéines, sa formation et son échange sont compatibles avec les conditions physiologiques mais aussi avec les milieux organiques. La formation de disulfure résultant de l'oxydation de deux thiols, l'oxygène de l'air peut suffire à cette réaction. L'échange entre disulfure correspond quant à lui à la SN_2 d'un thiolate sur un des deux atomes de soufre. Ainsi, deux possibilités existent pour geler l'équilibre : (1) un abaissement du pH empêche la formation de thiolate, bloquant la réaction de SN_2 , (2) une oxydation totale des thiols élimine la présence de thiolate et permet de bloquer l'échange de disulfure.⁸⁷ Un des autres avantages en CCD est la possibilité de réactiver très facilement une chimiothèque qui ne serait composée que de disulfures. En effet, l'ajout d'un agent réducteur dans le milieu (les plus utilisés étant le DL-dithiothréitol et le glutathion) permet de reformer des ions thiolates et de relancer l'échange thiolate/disulfure.

I.4.6.2.2. Formation de conformères

Cette réaction réversible possède toutefois quelques défauts. Dans une étude théorique publiée en 1975,¹¹⁹ il a été montré que la conformation la plus stable d'une liaison C-S-S-C correspondait à un angle dièdre de 90 degrés. La présence de cet angle rectangle pose deux problèmes en CCD. Tout d'abord, la formation de macrocycles est très largement favorisée ce qui se retrouve dans pléthore d'exemples de la littérature.^{89,120-125} De plus, les structures générées sont chirales et chaque pont disulfure implique la formation de deux stéréoisomères de configuration (conformères) ayant des angles dièdres opposés. Ainsi, même avec des macrocycles de petites tailles, un nombre conséquent de conformères peut être généré. En

nommant R le groupement prioritaire, si une rotation dans le sens horaire autour de la liaison S-S est nécessaire pour déplacer R vers R', alors le descripteur stéréochimique de l'angle associé est dit P et de signe positif. Dans le cadre d'un déplacement dans le sens antihoraire, il est noté M et est de signe négatif (Schéma 19).

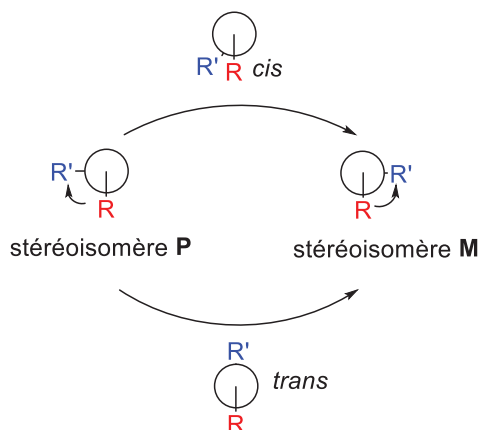


Schéma 19 : Représentation schématique des deux stéréoisomères associés à une molécule R'-S-S-R. Dans ce modèle, le groupement R est considéré comme prioritaire sur le groupement R' dans le cas où R = R'. Nomenclature utilisée pour décrire la chiralité hélicoïdale.

Ainsi, pour des macrocycles polydisulfures de taille 4, six conformères hypothétiques peuvent être obtenus (Figure 27) : deux *meso* (MMPP, MPMP), un homochiral (MMMM, PPPP) et un hétérochiral (PPPM, MMMP). Pour les composés de taille 3, quatre conformères peuvent être obtenus : un homochiral (MMM, PPP) et un hétérochiral (MPP/MMP)

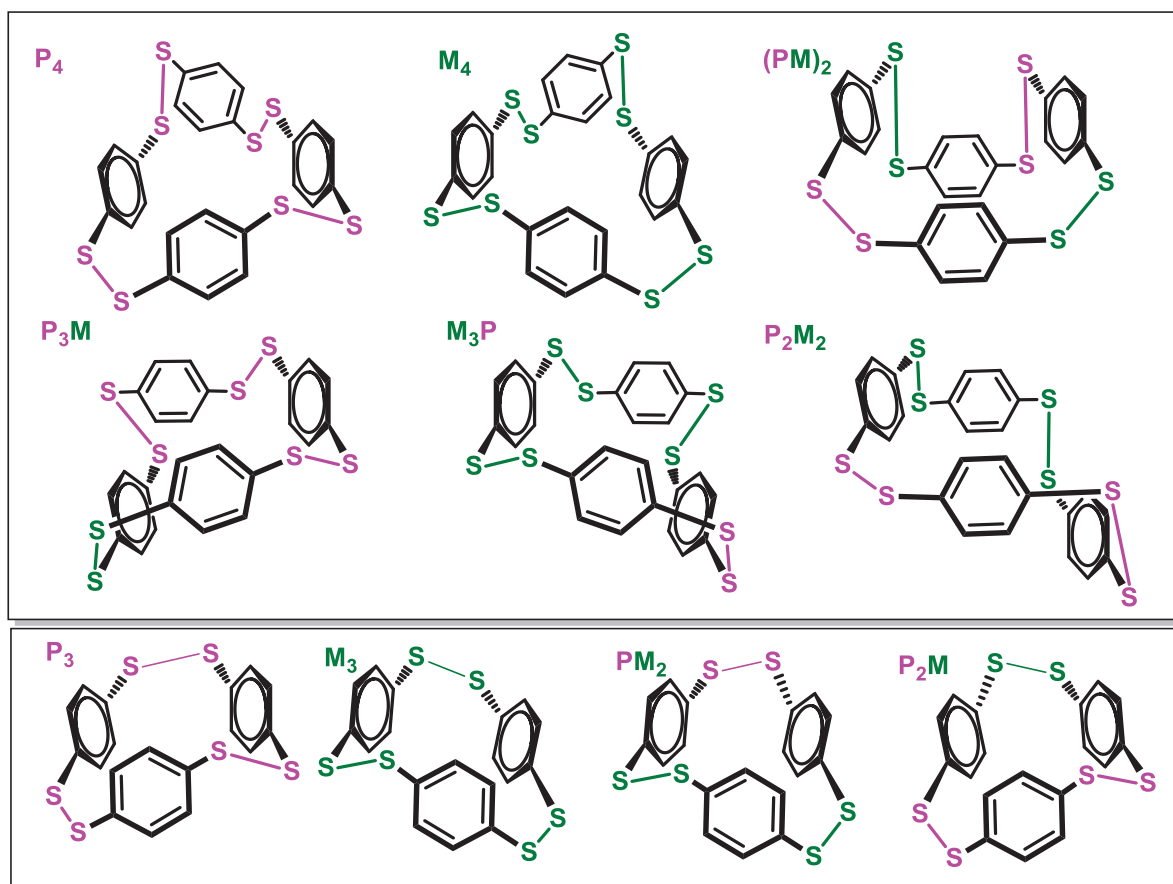


Figure 27 : Structure des composés macrocycliques polydisulfures de taille 3 et 4
La présence de ces divers conformères peut amener à une complexification des études par RMN. L'ajout de substituant sur les cycles benzéniques crée quant à lui des diastéréoisomères complexifiant l'étude par RMN et par HPLC.

I.4.6.3. La chimie combinatoire dynamique avec des liaisons disulfures

Le développement des disulfures en CCD revient au groupe de Sanders en collaboration avec Otto. Pour valider la possibilité d'utiliser la formation de polydisulfures comme réaction réversible en CCD, 6 dithiols (Schéma 20) structurellement différents furent sélectionnés et leur comportement en chimiothèque combinatoire dynamique mixte ou homogène étudié.¹²³ L'oxydation des dithiols fut suivie via le réactif d'Ellman et un temps moyen de 24 h pour la disparition totale des dithiols de départ fut déterminé. La composition des chimiothèques fut résolue via FTICR ESI-MS révélant la formation de macrocycles de tailles comprises entre 2 et 8. La réversibilité de la réaction fut établie en mélangeant deux chimiothèques pré-équilibrées et en réactivant la nouvelle chimiothèque avec du DTT. Enfin, la répétition de l'expérience précédente en abaissant le pH à 2.5 ne mena à aucune rééquilibration après 12 jours, validant que l'abaissement du pH permettait de stopper la réaction d'échange de ponts disulfures.

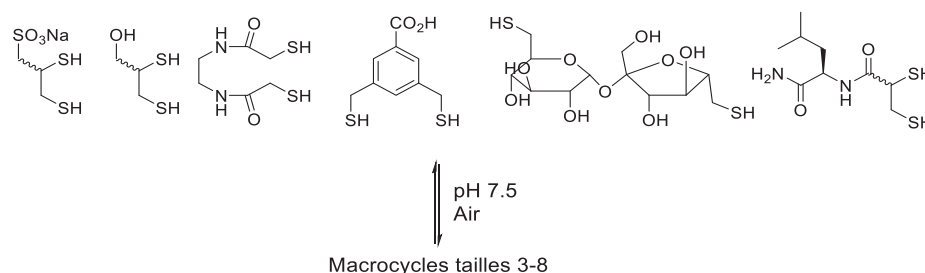


Schéma 20 : Briques moléculaires utilisées pour la première CCD des polydisulfures.

Depuis ces travaux initiaux, de nombreuses applications biologiques utilisant la liaison disulfure en CCD ont été publiées. Waters *et coll* ont mis à profit leurs précédentes études sur des mélanges de dithiols pour obtenir un récepteur moléculaire capable de reconnaître une modification post-traductionnelle : la méthylation de la lysine.¹²⁴ Pour cela, 8 briques moléculaires dithiols possédant des fonctions acides carboxyliques pour la solubilité et un noyau aromatique nécessaire à l'interaction π -cation entre le récepteur et la lysine *n* fois *N*-méthylée ($n = 0, 1, 2$ ou 3) ont été sélectionnées. Des premières chimiothèques ont montré l'amplification de deux composés très similaires : **I-51** et **I-76** (Figure 28). Pour pousser leur analyse, des chimiothèques biaisées contenant uniquement les fragments **I-73** et **I-74** (2 : 1) ou **I-73** et **I-75** (2:1) ont été testées en présence de la lysine *n* fois *N*-méthylée. Seule la chimiothèque contenant **I-73** et **I-74** donna des résultats probants et une amplification par un facteur 10 des composés *meso*-**I-51** et *rac*-**I-51** fut observé en présence de lysine tri-*N*-méthylée. Après isolement des deux composés par HPLC semi-préparative, leurs constantes de dissociation en présence des lysines *n* fois *N*-méthylée ont pu être déterminées par anisotropie de fluorescence. Ces dernières se sont révélées similaires à celle du ligand naturel : le chromodomaine HP1.

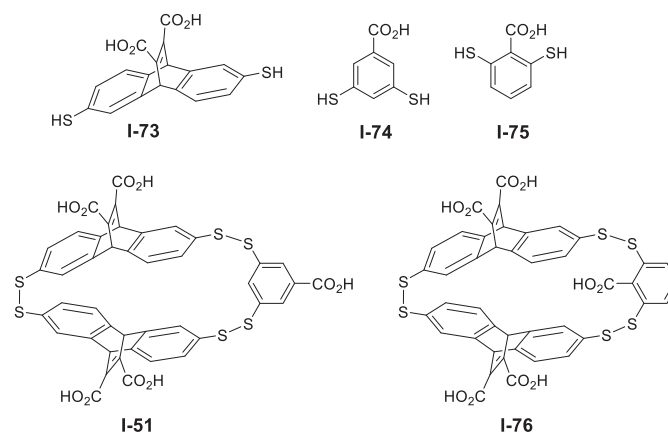


Figure 28 : Briques moléculaires actives et composés amplifiés par CCD en présence de lysine *n* fois *N*-méthylée.

En 2009, Ciulli *et coll* publient une application de la CCD des liaisons disulfures en présence de protéine.¹²⁶ Leurs travaux ont porté sur l'enzyme pantothénate synthétase de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. La structure de l'enzyme ayant déjà été résolue, ils ont observé que le site actif de l'enzyme se décomposait en plusieurs poches reconnaissant l'adénosine, le pantoate et les phosphates. Ils ont créé une chimiothèque combinatoire dynamique avec une

brique moléculaire de type 5'-thioadénosine servant de point d'ancrage et diverses molécules thiolées supposées capables de se fixer dans les autres poches de liaison. Huit thiols (**I-78a-h**) furent sélectionnés et la chimiothèque fut générée en conditions anaérobiques, en utilisant un tampon mélangeant le glutathion réduit et oxydé (4:1) pour atteindre un équilibre orienté vers les thiols libres (Schéma 21). En présence de l'enzyme, un composé (**I-79a**) fut fortement amplifié. Fondés sur ces résultats, des analogues de **I-79a** furent synthétisés et leurs affinités mesurées par ITC. Les résultats de ces analyses montrèrent une augmentation de l'affinité lorsqu'un groupement *meta*-nitro était ajouté, la constante de dissociation passant de 380 μM pour la 5'-thioadénosine **I-77** à 80 μM pour le composé **I-80**. Cette méthodologie alliant CCD et approche SBDD semble prometteuse pour l'identification rapide de molécules cibles pour l'industrie pharmaceutique.

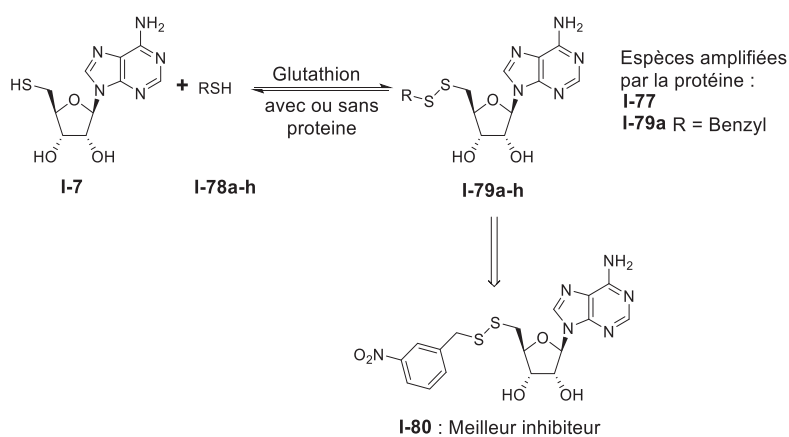


Schéma 21 : Chimiothèque de thiols en présence de 5'-thioadénosine et espèces amplifiées. Inhibiteur **I-80** dérivant de la CCD.

Erlanson *et coll* ont développé une approche singulière pour identifier des inhibiteurs de la kinase Aurora A.¹²⁷ Comme toutes les kinases, elle possède un site de liaison permettant de lier l'ATP et de nombreux inhibiteurs ont été développés en ciblant cette poche de la protéine. Toutefois, un des grands défis à l'heure actuelle est de développer des inhibiteurs spécifiques à une kinase. Il a été démontré qu'à proximité de ce site de liaison existe une région de la protéine propre à chaque kinase possédant un site de liaison unique où des inhibiteurs spécifiques de la kinase peuvent venir se greffer. Erlanson *et coll* ont décidé d'appliquer la CCD à cette zone de la protéine. Pour cela, ils ont exprimé une cystéine à proximité du site de liaison de l'ATP. Via la formation d'un pont disulfure, ils ont relié de manière covalente la protéine au composé **I-81** possédant un motif 4,6-diaminopyrimidine reconnu par le site de liaison de l'ATP (Schéma 22).

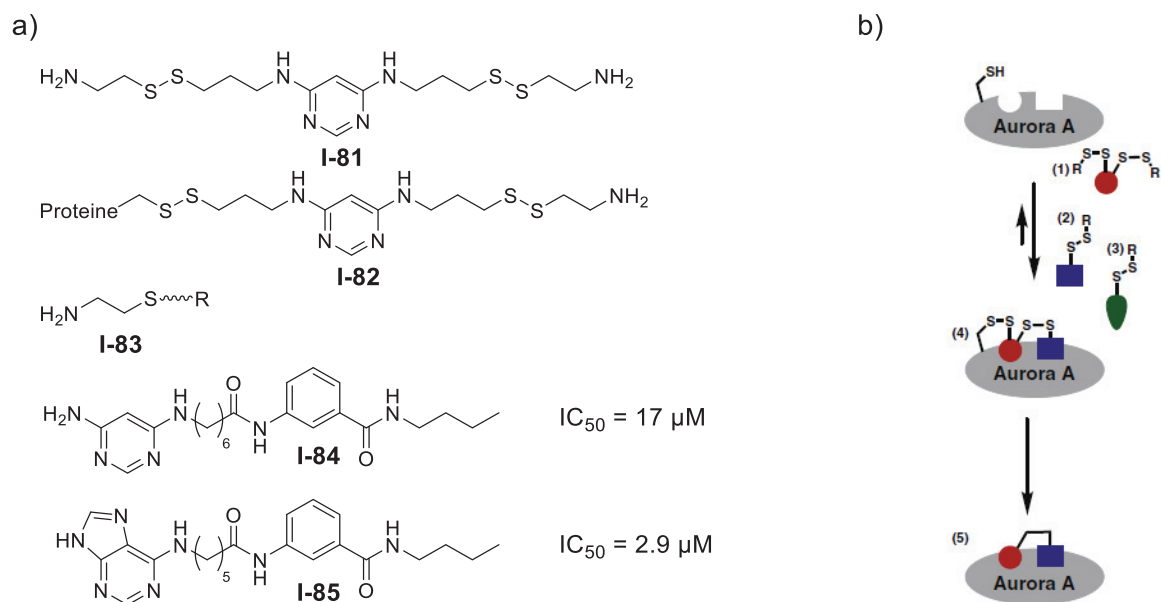


Schéma 22 : a) Système combinatoire dynamique et inhibiteurs de Aurora A. b) Représentation schématique du processus de découverte des nouveaux inhibiteurs.

I-81 portant un deuxième bras espaceur capable de faire de l'échange de disulfure, ils ont criblé de multiples molécules portant un thiol pour trouver des inhibiteurs potentiels de l'Aurora A (Schéma 22b). Ces derniers ont été identifiés par spectrométrie de masse et leurs versions statiques où le pont disulfure a été remplacé par une liaison carbone-carbone ont été synthétisés. Les IC_{50} de l'ordre du micromolaire des molécules **I-84** et **I-85** montrent la viabilité de cette stratégie pour identifier des inhibiteurs spécifiques de la protéine (Schéma 22a).

De ces diverses applications de la CCD avec la liaison disulfure, il ressort que celle-ci est viable dans son utilisation avec les biomolécules, que ce soit des protéines ou de petites molécules organiques telle la lysine. La compatibilité de la formation et de l'échange de ponts disulfures avec les conditions physiologiques permet une stabilité de la cible et une oligomérisation rapide des briques moléculaires de départ. Une des précautions à prendre est de vérifier que la biomolécule ne comporte pas de groupement cystéine facilement accessible pour éviter que celle-ci n'interfère avec l'équilibration des synthons. Par comparaison avec les hydrazones, la liaison disulfure semble plus adaptée pour travailler avec des protéines.

I.5 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons vu que la lutte contre *Pseudomonas aeruginosa* ne passait pas forcément par la destruction de la bactérie mais que d'autres méthodes visant à rendre inefficace son adhésion ou ses vecteurs de virulence existent. Au sein de notre laboratoire, la stratégie sélectionnée vise à empêcher l'adhésion cellulaire du pathogène. Pour cela, diverses molécules possédant des cœurs aromatiques et des valences variées ont été synthétisées dans le but d'inhiber les lectines LecA et LecB, reconnues comme prenant part à l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa*. Des résultats prometteurs ont été obtenus et un calix[4]arène 1,3-alterné s'est révélé un excellent ligand de ces lectines possédant des propriétés *in vitro* et *in*

vivo très intéressantes. Toutefois, la synthèse linéaire de nombreux glycoclusters ne répond pas à la question que nous nous posons. Avions-nous synthétisé le meilleur ligand possible ? Pour répondre à cette question, nous avons décidé d'interroger directement les lectines en nous reposant sur les concepts de la chimie combinatoire dynamique.

Dans cette application de la chimie, toutes les molécules formées sont interconvertibles via une ou des liaisons réversibles. Ainsi, la distribution d'espèces obtenue ne dépend que de la stabilité thermodynamique intrinsèque des composés. En appliquant un *stimulus* extérieur, la stabilité des composés peut varier et entraîner une modification de la distribution d'espèces favorisant celles stabilisées par le *stimulus*. En utilisant les lectines de *Pseudomonas aeruginosa* comme *stimuli*, il est ainsi possible d'amplifier leurs meilleurs ligands.

Pour travailler en présence de biomolécules, il n'est toutefois pas possible d'utiliser n'importe quelle réaction réversible. En effet, celle-ci doit être compatible avec la biomolécule et les conditions opératoires. A partir des exemples bibliographiques, nous avons observé une tendance à travailler en présence d'hydrazones, d'acylhydrazones ou de disulfures. Il nous a paru judicieux de travailler avec ces derniers. Les raisons sous-jacentes étaient que les disulfures ont la faculté d'être équilibrés en absence de toute autre molécule (aniline) dans les conditions physiologiques contrairement aux (acyl)hydrazones. De plus, l'arrêt de la réaction implique de diminuer le pH ce qui a pour conséquence de dégrader la plupart des protéines et de libérer facilement les espèces liées. Enfin, les probabilités sont grandes d'obtenir des macrocycles de taille variant entre 3 et 5.^{120,121} Ainsi, selon le choix des briques moléculaires de départ, il est possible de s'approcher structurellement des calixarènes et des pillararènes précédemment développés par notre laboratoire.^{34,35,49,50}

Quatre briques moléculaires de structures variées ont été choisies selon leurs tendances à former des macrocycles ainsi que pour leurs valences diverses.

Dans le prochain chapitre, nous verrons les synthèses mises en œuvre pour synthétiser ces différentes briques moléculaires. Nous nous attarderons notamment sur les différentes méthodes permettant l'introduction d'un thiol aromatique.

Chapitre 2

Synthèses de briques dithiolées glycosylées pour le criblage par chimie combinatoire dynamique

II.1. INTRODUCTION

L'objectif de notre projet était de prouver conceptuellement que l'échange de pont disulfure en présence de lectine permettait l'observation d'amplification significative de certains ligands glycosylés. L'identification du meilleur ligand de la protéine n'était pas l'objectif visé. Dans ce chapitre, nous allons aborder la synthèse des quatre briques moléculaires destinées à produire et cribler par CCD des cyclooligomères candidats-ligands de différentes lectines.

Tous reposent sur une structure commune (Figure 1) comportant 3 domaines majeurs :

- (1) Un noyau aromatique dithiolé pour (a) la formation réversible de ponts disulfure et dont les propriétés UV permettent (b) le suivi cinétique de la réaction ainsi que (c) l'identification des espèces formées par HPLC-MS.
- (2) Un bras espaceur séparant les épitopes du noyau réactif pour optimiser l'accès aux sites de liaison des lectines.
- (3) Un épitope saccharidique de la lectine ciblé.

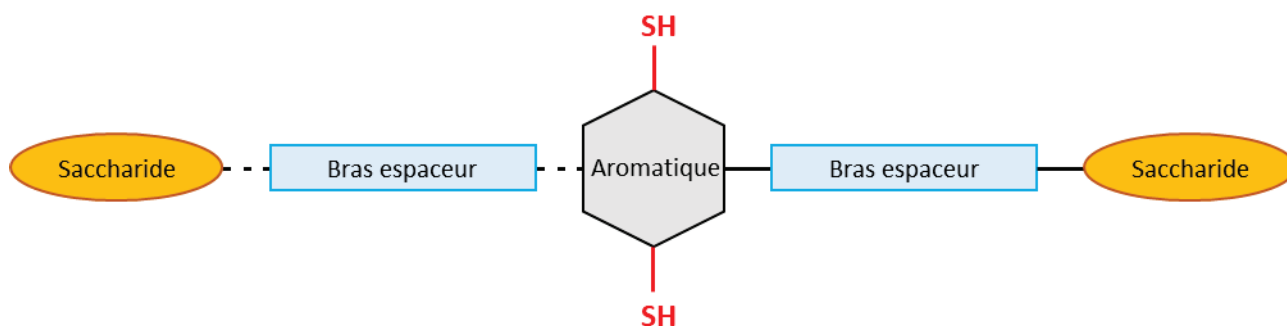


Figure 1 : Représentation schématisée des briques moléculaires cibles pour la CCD

II.1.1. Sélection des noyaux aromatiques

Quatre précurseurs dithiophénol ont été sélectionnés et leurs synthèses entreprises (Figure 2).

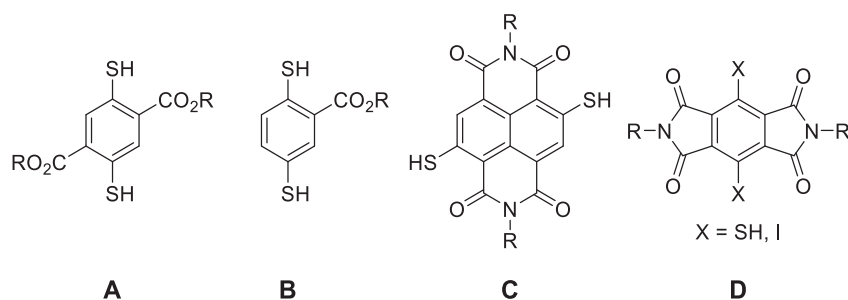


Figure 2 : Noyaux aromatiques cibles, R : bras espaceur + saccharide

Le noyau aromatique **A** forme le point de départ de notre étude. En effet, les propriétés en CCD du diacide lorsque R = H ont été étudiées par le groupe de Sanders puis approfondies par notre laboratoire.^{120,121} Ses capacités de reconnaissance moléculaire fondées sur les fonctions carboxylates acceptrices de liaisons hydrogène et ponts salins ainsi que la mise au point d'une synthèse par effet template à l'échelle du gramme permettant l'obtention sélective de

l'homotrimère¹²⁸ et de l'homotétramère¹²¹ nous laisse envisager une possible post-fonctionnalisation des macrocycles sur leurs fonctions acide.

Le deuxième noyau aromatique **B**, est le pendant de **A** avec un seul groupement fonctionnel. Cette brique moléculaire nous permet de réduire la valence des cyclooligomères formés et de s'approcher des structures calix[4]arènes^{34,35,129} développées par notre laboratoire dans le cadre de la stratégie anti-adhésive contre *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, il permet l'accès à des structures de valence impaires (Figure 3).

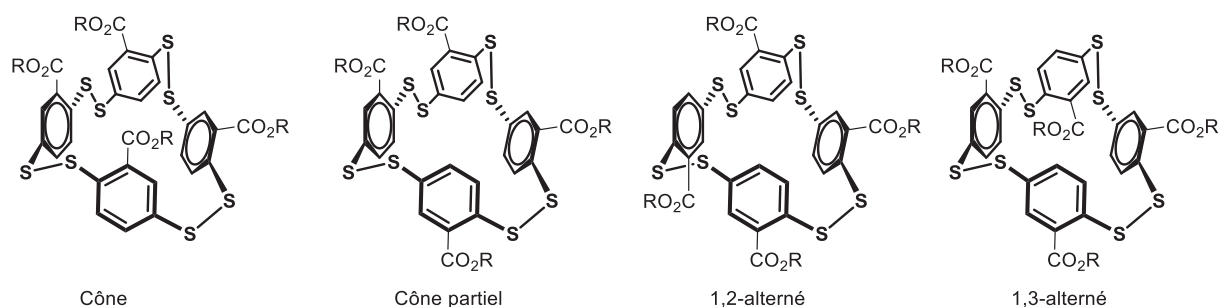


Figure 3 : Potentiels cyclotétramères issus de la brique **B**

Le composé **C** possède un noyau naphthalène diimide. Indépendamment de la synthèse de la brique portant les monosaccharides, l'accès à un naphthalène tétra-acide dithiolé pouvant s'auto-assembler en macrocycles de diamètres internes importants permet d'envisager des applications dans le domaine de la reconnaissance moléculaire de molécules organiques. Enfin, les potentielles propriétés fluorescentes des objets formés en font de bons candidats pour des études en présence de la bactérie.

Le dérivé pyroméllitique **D** répond à deux stratégies différentes. Lorsque X est un halogène, un couplage de Sonogashira avec la butadiyne donne accès à des chaînes polymériques linéaires porteuses d'un grand nombre d'épitopes saccharidiques. L'accès à la CCD est permis lorsque X est un thiol. Toutefois, l'encombrement stérique autour des positions thiolées laisse espérer la formation de chaînes linéaires ou de macrocycles de grandes tailles.

Via ces quatre noyaux aromatiques, nous pouvons espérer l'accès à des macrocycles de petites ou grandes tailles, à des chaînes linéaires et des polymères, le tout amenant à des valences très variées. Ainsi, nous possédons potentiellement une boîte à outils composée de divers objets moléculaires permettant de répondre aux différents besoins des lectines.

II.1.2. Sélection des bras espaceurs

Les deux bras espaceurs envisagés sont très similaires (Schéma 1). Pour les noyaux aromatiques **A** et **B**, la chaîne triéthylèneglycol **E** est utilisée pour créer un lien amide avec les acides carboxyliques du noyau aromatique.

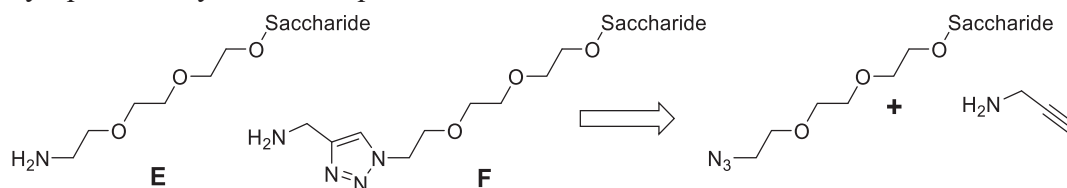


Schéma 1 : Bras espaceur sélectionnés.

La formation de diimide nécessitant un excès d'amine, il nous a paru raisonnable d'utiliser le bras espaceur **F** pour les noyaux aromatiques **C** et **D**. En effet, l'utilisation d'une amine peu couteuse comme la propargylamine pour former le diimide puis la cycloaddition CuAAC avec notre bras espaceur triéthylèneglycol fonctionnalisé avec un azoture devrait donner d'excellents rendements et permet d'éviter l'utilisation de l'amine **E** couteuse à produire.

II.1.3. Sélection des saccharides

Enfin, quatre monosaccharides ont été sélectionnés pour leur affinité vis-à-vis des différentes lectines de notre étude (Figure 4). Le galactose est un épitope de LecA ; LecB reconnaît prioritairement le fucose et dans une moindre mesure le mannose ; ConA est connue pour son affinité avec le mannose. Enfin, le glucose a été choisi comme témoin négatif pour LecA et LecB ainsi que pour sa faible affinité avec ConA.

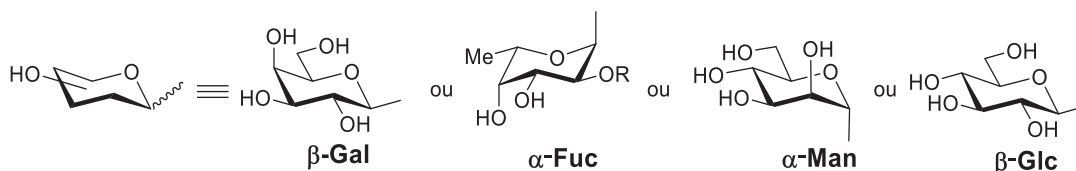


Figure 4 : Saccharides sélectionnés pour la CCD : galactose (Gal), fucose (Fuc), glucose (Glc), mannose (Man).

II.2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA THIOLATION AROMATIQUE

L'étape limitante pour la fonctionnalisation des noyaux aromatiques reste l'introduction de fonctions thiol. La nucléophilie intrinsèque des thiolates en fait de bons candidats pour la réaction de S_N2 en série aliphatique. Toutefois, sur des molécules aromatiques, il est bien plus difficile d'introduire des fonctions thiol, qui plus est sous forme protégée. Dans cette partie, nous allons décrire les voies de synthèse usuelles permettant l'accès à des noyaux aromatiques porteurs de fonctions thiol protégées.

II.2.1. Le réarrangement de Newman-Kwart

II.2.1.1. Le réarrangement Newman-Kwart activé thermiquement

La technique la plus usitée à l'heure actuelle a été découverte indépendamment par les groupes de Newman¹³⁰ et de Kwart¹³¹ en 1966. Sa facilité de mise en œuvre donna un essor important à cette réaction qui est maintenant connue sous le nom de « réarrangement de Newman-Kwart ». Cette réaction consiste au réarrangement d'un *O*-thiocarbamate (**II-1**) en *S*-thiocarbamate (**II-2**) via une activation (Schéma 2).

Initialement, le réarrangement de Newman-Kwart a été réalisé grâce à une activation thermique (150-350°C), Newman *et al* ont étudié l'influence des substituants du cycle benzénique sur la

réactivité.¹³⁰ De leur étude, il apparaît clairement que la présence de groupement(s) électroattracteur(s) facilite le réarrangement en abaissant la température de réaction (170°C pour le 2-nitrophényl vs 280°C pour le 2-méthoxyphényl).

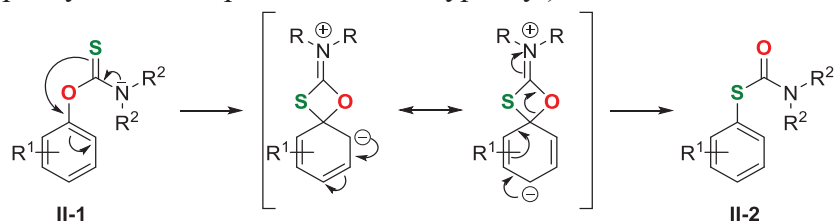


Schéma 2 : Mécanisme du réarrangement de Newman-Kwart

Le mécanisme réactionnel implique un intermédiaire à 4 centres (Schéma 2). Toutefois, Gilday *et al* ont constaté que la cinétique de la réaction n'est pas rigoureusement d'ordre 1 et ont postulé une compétition entre des processus uni- et bimoléculaires lorsque le chauffage est effectué à l'aide d'un micro-onde (Schéma 3).¹³² De récentes études menées par le groupe de Lloyd-Jones ont infirmé ces conclusions en attribuant les écarts observés par Gilday *et al* à des biais expérimentaux.¹³³

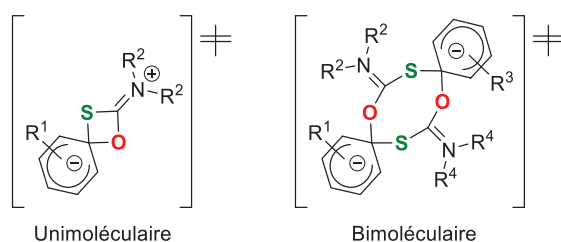


Schéma 3 : Processus uni- et bimoléculaires postulés pour le réarrangement de Newman-Kwart.

Le grand avantage du réarrangement de Newman-Kwart provient de la disponibilité des briques moléculaires de départ. En effet, alors qu'il est difficile de trouver des thiophénols, le phénol correspondant est souvent commercial. A partir d'un substrat phénolique **II-3**, l'enchaînement des réactions de thiocarbamatation, réarrangement de Newman-Kwart et déprotection permet l'accès rapide au thiophénol **II-5** (Schéma 4).

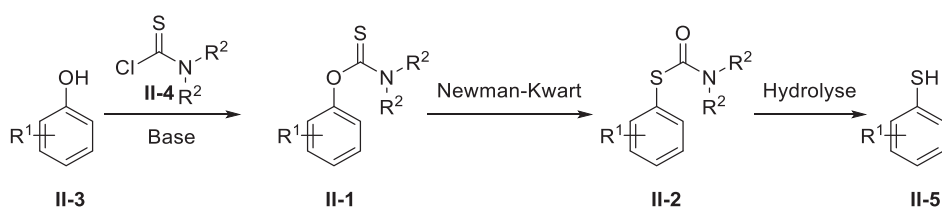


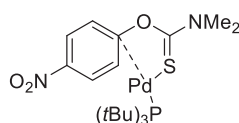
Schéma 4 : Voie de synthèse d'un thiophénol via le réarrangement de Newman-Kwart

Un autre avantage de cette réaction est la possibilité de travailler sans solvant lorsque le point de fusion de la molécule est inférieur à celui de sa dégradation. Enfin, la réaction est très propre et les rendements observés sont majoritairement > 70%.

La réaction initiale proposée par Newman et Kwart souffre tout de même de limitations. En effet, des groupements électroattracteurs sur le noyau aromatique sont nécessaires pour accélérer et faciliter la réaction. De plus, les conditions de chauffage à haute température (>

200-300°C) ne sont compatibles qu'avec des substrats robustes (non thermolabiles). Ainsi, un optimum entre températures de réaction et de dégradation du composé est à déterminer pour obtenir une cinétique de réaction raisonnable tout en gardant un rendement et une pureté élevés. Pendant de nombreuses années, le réarrangement du *O*- en *S*-thiocarbamate n'a pu être activé que par voie thermique même si l'arrivée du micro-onde a permis de limiter partiellement le phénomène de dégradation thermique des substrats et produits.

Durant la dernière décennie, trois nouvelles stratégies synthétiques ont été développées pour circonvenir à ces problèmes et notamment pour étendre le spectre des substrats et produits possibles. La première, développée par l'équipe de Lloyd-Jones facilite la réaction en modifiant le mécanisme réactionnel grâce à un complexe de palladium.¹³⁴ Un mécanisme à 5 centres (**II-6**) a été proposé en s'appuyant sur des études de modélisation moléculaire par calcul DFT (Figure 5).



II-6

Figure 5 : Intermédiaire-clé proposé pour le réarrangement de Newman-Kwart en présence de $[Pd(tBu_3P)_2]$.

Grâce à cette activation, la température nécessaire pour activer la réaction est abaissée à 100°C dans le toluène. Toutefois, cette méthodologie reste très limitée. En effet, les substrats de départ doivent être solubles dans le toluène et doivent porter des groupements fortement électroattracteurs en *para*. De plus, seul le complexe $[Pd(tBu_3P)_2]$ est capable de catalyser la réaction, les autres espèces de Pd(0) utilisées n'ont pas permis d'effectuer la transformation souhaitée.

II.2.1.2. Le réarrangement de Newman-Kwart activé par oxydation

Plus récemment, le groupe de Nicewicz a décrit le premier réarrangement de Newman-Kwart effectuée via un mécanisme photorédox.¹³⁵ Leur stratégie repose sur l'hypothèse que l'oxydation du *O*-thiocarbamate **II-7** faciliterait l'attaque du soufre sur le carbone *ipso*. Après optimisation, l'utilisation du photocatalyseur organique tétrafluoroborate de 2,4,6-tri(*p*-tolyl)pyrilium en présence de lumière bleue a permis de réaliser le réarrangement à température ambiante dans l'acétonitrile en 24 h avec des rendements > 90% (Schéma 5).

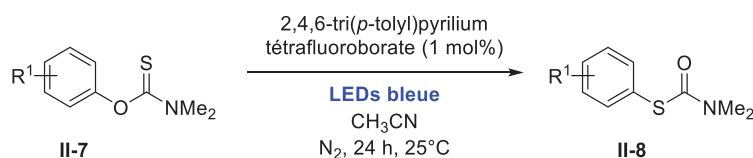


Schéma 5 : Réarrangement de Newman-Kwart par voie photorédox

Il a été observé que la dilution du milieu permettait d'augmenter sensiblement la cinétique. Le spectre de la réaction a été identifié : contrairement aux conditions thermiques, cette voie réactionnelle est favorisée par les groupements électrodonneurs. Toutefois, la réaction ne

fonctionne pas lorsqu'un halogène est présent ou quand un groupement encombrant (phényl / *tert*-butyl) se trouve en *ortho* du *O*-thiocarbamate. Cette méthode a l'avantage d'éviter la dégradation thermique des substrats et produits et d'étendre la réaction aux cycles benzéniques portants des groupements électrodonneurs.

La dernière méthode a été développée par le groupe de Pittelkow.¹³⁶ En se fondant sur les travaux de Nicewicz, ils exploitent le rôle supposé de l'oxydation du thiocarbamate dans l'activation du réarrangement. Pour conforter cette hypothèse, divers oxydants ont été testés. Si la DDQ, le PIDA, et le PIFA n'ont donné d'autres résultats que la transformation du *O*-thiocarbamate **II-9** en carbamate **II-11**, le nitrate d'ammonium cérique (CAN) placé en quantité stœchiométrique dans un solvant polaire (DMSO) et sous atmosphère inerte a permis un réarrangement quantitatif du produit de départ en *S*-thiocarbamate **II-10** à température ambiante (Schéma 6).

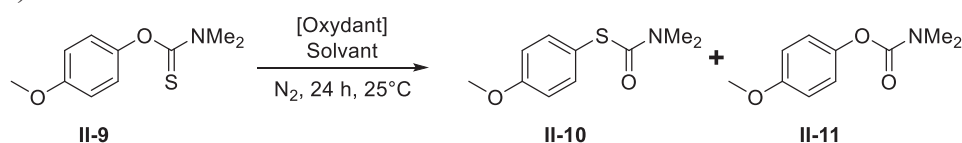


Schéma 6 : Formation du *S*-thiocarbamate par oxydation et réaction parasite

Le spectre de la réaction a été caractérisé et a montré qu'un groupement mésomère donneur en position *ortho* ou *para* était nécessaire pour que la réaction ait lieu. Les auteurs ont démontré que le système était capable de fonctionner avec le CAN en quantité catalytique (10%), en utilisant l'oxygène de l'air pour régénérer le Cerium(IV) à partir de sa forme réduite. La molarité de la réaction a aussi été étudiée. Le mélange de deux espèces (**II-9** et **II-12**) n'a montré aucune formation de produits issus d'une réaction bimoléculaire (**II-14** et **II-15**) (Schéma 7).

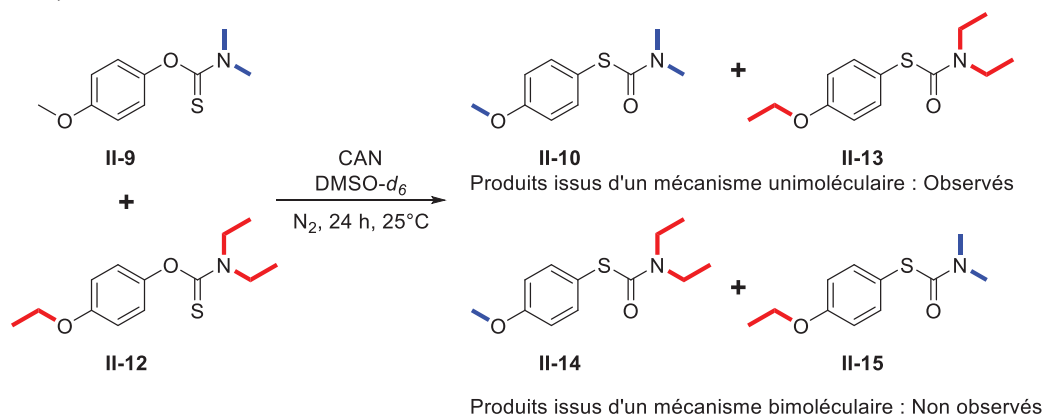


Schéma 7 : Réaction test pour vérifier la molarité du réarrangement de Newman-Kwart.

Les auteurs en concluent que, comme dans le cas de l'activation thermique, la réaction est unimoléculaire. Cette dernière voie de synthèse reste la plus élégante par sa simplicité de mise en œuvre et son coût. De plus, les rendements > 90% pour les espèces riches en électron offrent une voie complémentaire au réarrangement thermique.

En parallèle de ces travaux sur les phénols, le groupe de Pittelkow a appliqué cette méthodologie à des *O*-thio- ou *O*-sélénocarbamate en position benzylique.¹³⁷ Bien que les

rendements soient plus faibles qu'en série phénylique, oscillant entre 30 et 65%, il s'agit de la première publication sur la mise en œuvre du réarrangement de Newman-Kwart sur des substrats autres que les phénols.

Le développement de ces trois nouvelles méthodologies complète le spectre d'utilisation du réarrangement de Newman-Kwart (Tableau 1). Il est désormais possible de travailler sur des substrats phénoliques possédant des groupements électrodonneurs ou électroattracteurs à des températures auxquelles aucune dégradation n'est observée.

Tableau 1 : Conditions développées pour le réarrangement de Newman-Kwart.

Conditions	Substituant	Température	Référence
Thermique	Electroattracteur	>150°C	130,131
[Pd(<i>t</i> Bu ₃ P) ₂]	Electroattracteur en <i>para</i>	100°C	134
Photorédox	Electrodonneur	25°C	135
CAN	Mésomère donneur en <i>ortho</i> ou <i>para</i>	25°C	136

II.2.2. Les couplages métallo-catalysés

Depuis la découverte du réarrangement de Newman-Kwart, d'autres méthodes ont été mises au point pour l'introduction d'une fonction thiol sur un substrat aromatique. Parmi elles, les techniques de couplages en présence de divers métaux ont une place prédominante.

II.2.2.1. La catalyse au Nickel

Une des premières méthodologies développées pour l'introduction d'une fonction thiol par catalyse métallique utilise le nickel.¹³⁸ En 1986, Tagaki décrit l'insertion d'un motif isothiuronium sur des dérivés benzéniques halogénés (Schéma 8).

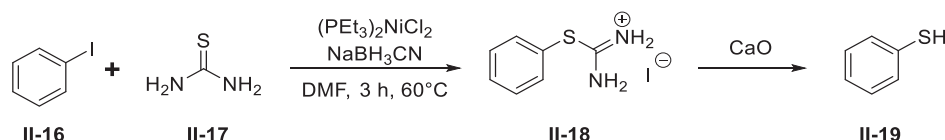


Schéma 8 : Synthèse de thiophénol via une catalyse au nickel et un intermédiaire isothiuronium

Pour cela, du Ni⁰ est généré *in situ* par réduction du chlorure de bis(triéthylphosphine)nickel (II) par le cyanoborohydrure de sodium. L'addition de thiourée II-17 sur le iodobenzène II-16 permet d'obtenir l'intermédiaire isothiuronium II-18 qui est ensuite hydrolysé *in situ* par CaO pour obtenir le thiophénol II-19.

Un exemple plus récent développé par Johannes *et coll* associe la catalyse au nickel à l'activation par voie photorédox.¹³⁹ En s'inspirant des travaux de MacMillan sur les couplages C-O catalysés par le nickel en présence d'iridium, les auteurs ont mis au point une méthodologie permettant l'introduction de radicaux thiyle sur des iodures phényles II-21a (Schéma 9).

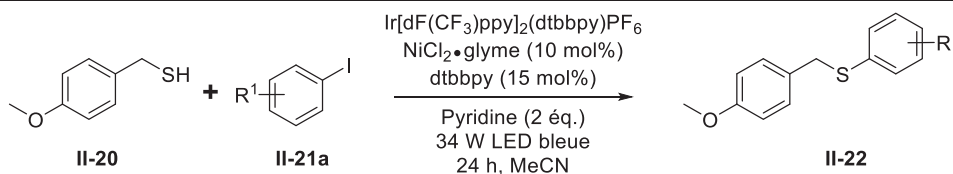


Schéma 9 : Double catalyse Ni/Ir pour la formation de thioéther

La double catalyse Ni/Ir présente l'avantage d'utiliser des conditions douces et d'être compatible avec un grand nombre de fonctions chimiques. Ayant établi les conditions opératoires avec le 4-méthoxybenzylthiol **II-20**, d'autres substrats thiolés ont été testés. A l'exception des thiols très encombrés (adamantyle), les rendements obtenus sont excellents (>85%). L'étude de la compétition entre couplage C-O (4-méthoxybenzylalcool) et C-S (4-méthoxybenzylthiol **II-20**) en présence d'un dérivé iodé a montré la prédominance du couplage avec le radical thiyle.

II.2.2.2 La catalyse au cuivre

En 2009, le groupe de Dawei Ma publie une étude méthodologique décrivant l'accès à des thiols aromatiques libres ou protégés en employant CuI comme source de cuivre, du soufre élémentaire et des iodures d'aryle **II-21a**.¹⁴⁰ Après réaction, un mélange de disulfure (**II-23**) et de thioéther (**II-24**) est obtenu (Schéma 10).

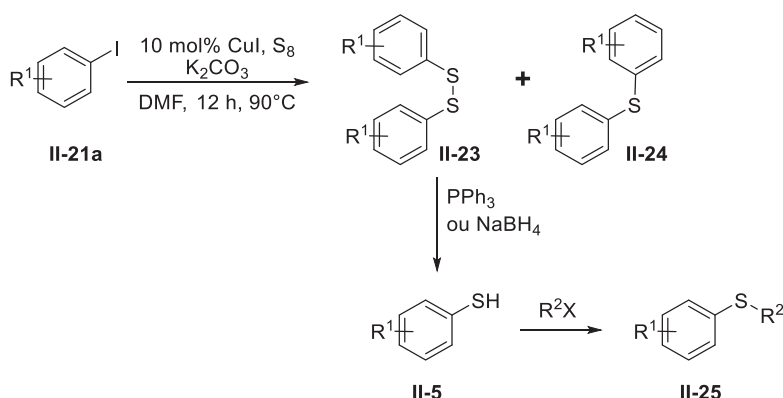


Schéma 10 : Conditions réactionnelles pour l'échange iode-soufre en présence de CuI

La réduction du disulfure **II-23** par NaBH₄ ou PPh₃ permet de (re)générer le thiophénol **II-25**. En ajoutant un halogénure d'alkyle, il est possible de protéger le thiol *in situ* (**II-26**). Une exemplification extensive a été menée, soulignant la polyvalence de la méthodologie. En effet, celle-ci donne de très bons résultats quels que soient les substituants portés par le noyau aromatique (électrodonneur, électroattracteur) avec des rendements > 85%. Cependant, la réaction est chimiosélective vis-à-vis des dérivés iodés ce qui constitue une limitation car l'accès à ces substrats est souvent plus difficile qu'à leurs équivalents bromés ou chlorés.

Quelques années plus tard, Feng *et coll* ont démontré la capacité des nanoparticules de cuivre à catalyser la synthèse de thiophénol dans l'eau à partir d'halogénures phényles **II-26** (Schéma 11).¹⁴¹ La réaction a lieu à faible température et le catalyseur peut être recyclé en fin de réaction.

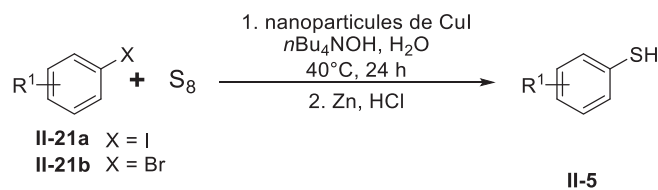


Schéma 11 : Synthèse de thiophénol à partir d'halogénure d'aryle via une catalyse par nanoparticules de cuivre

Comme pour la réaction développée par Ma *et coll*, les dérivés iodés se sont révélés d'excellents substrats. Quels que soient leurs substituants (électroattracteur/électrodonneur), les rendements obtenus sont > 85%. Toutefois, seuls les dérivés bromés appauvris en électrons réagissent pour donner l'aryle thiol **II-5** correspondant.

II.2.2.3 Le couplage à l'étain

Une troisième possibilité est d'utiliser le couplage de Stille impliquant l'utilisation de sels d'étain pour insérer la fonction thiol sous forme protégée. Trois étapes sont nécessaires pour générer le sel d'étain **II-29** permettant l'introduction d'une fonction mercaptopropionitrile sur des substrats hétéroaromatiques (Schéma 12).¹⁴²

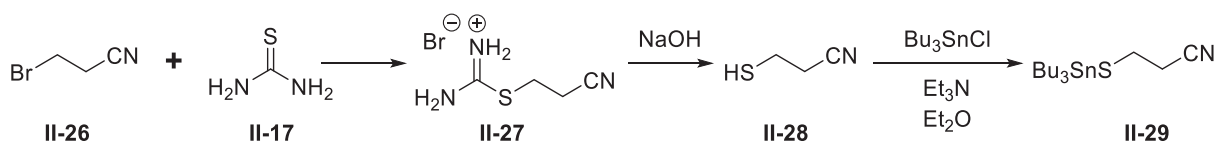


Schéma 12 : Synthèse de l'organostannique $\text{Bu}_3\text{SnS}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$

L'utilisation du réactif **II-29** en présence de palladium (0) a été testée sur des dérivés bromothiophène (**II-30/II-31/II-32**) avec des rendements de 30 à 70% (Schéma 13).

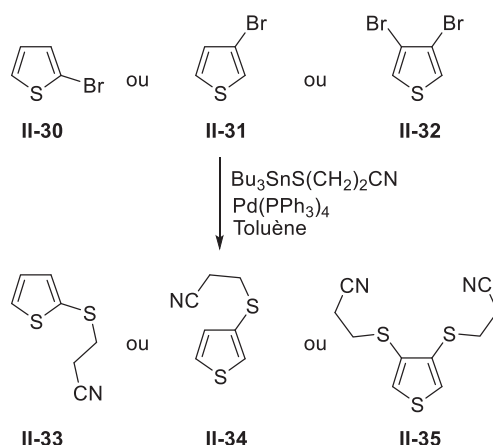


Schéma 13 : Utilisation de l'organostannique $\text{Bu}_3\text{SnS}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ sur des bromothiophènes.

L'extension à des thiophènes polybromés a permis d'effectuer jusqu'à 3 substitutions avec un rendement final de 80%, montrant la robustesse de la réaction. Néanmoins, cette voie de

synthèse est assez difficile à mettre en place car elle requiert l'utilisation de composés toxiques (sels d'étain). De plus, plusieurs purifications par distillation sont nécessaires pour obtenir l'organostannique dont la stabilité reste faible.

II.2.2.4 La catalyse au palladium

Bien que le soufre soit connu comme poison des catalyseurs au palladium dû fait de la forte stabilité de la liaison palladium-soufre, plusieurs méthodologies de synthèse de thiophenols catalysée par ce métal ont été publiées.

En 1996, Arnould *et al* décrivent la formation de thiophénol à partir de phénol via le triflate **II-36**, l'introduction du silanethiol étant catalysée par le tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0) (Schéma 14).¹⁴³

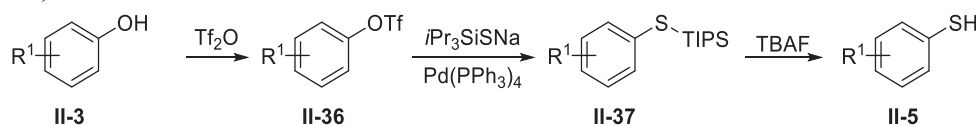


Schéma 14 : Synthèse d'un thiophénol à partir d'un triflate

L'accès au thiophénol **II-5** est alors possible via la déprotection du groupement TIPS par des ions fluorures (TBAF). Les rendements obtenus varient entre 40-85% en fonction des substituants portés par le noyau aromatique. Toutefois, l'exemplification est limitée à 8 composés benzénique, naphthalénique ou hétéroaromatique et cette méthodologie utilise les mêmes substrats (phénol) que ceux du réarrangement de Newman-Kwart qui reste plus efficace.

Plus récemment, Lai *et al* ont développé une méthodologie permettant de substituer un groupement triflate ou un atome de brome par un thioacétate **II-39** sur un noyau aromatique (Schéma 15).¹⁴⁴

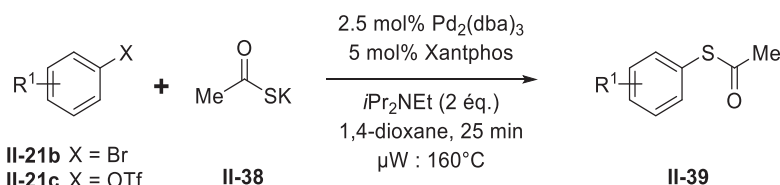


Schéma 15 : Couplage pallado-catalysé de bromure/triflate d'aryle avec le thioacétate de potassium sous activation micro-onde.

L'utilisation d'une activation micro-onde s'est révélée cruciale pour obtenir des rendements >85%. Le système catalytique se compose du Pd₂(dba)₃ avec la Xantphos comme ligand. Bien que moins réactifs, les substrats riches en électrons sont tout de même substitués avec des rendements > 50%. Toutefois, plusieurs substituants dont les nitros et les carboxybenzyles ne sont pas tolérés car sources de réactions secondaires avec le thioacétate de potassium **II-38**. De plus, les dérivés chlorés ne sont pas réactifs dans ces conditions.

En vue de l'obtention de thioéthers, Hartwig *et coll* ont développé une méthodologie pour introduire par voie pallado-catalysée le groupement TIPS sur un noyau aromatique.¹⁴⁵ En se basant sur les travaux de Arnould¹⁴³ et Bräse,¹⁴⁶ la substitution d'un atome de brome par un groupement TIPS-S a pu être effectué grâce à une catalyse au palladium (Schéma 16).

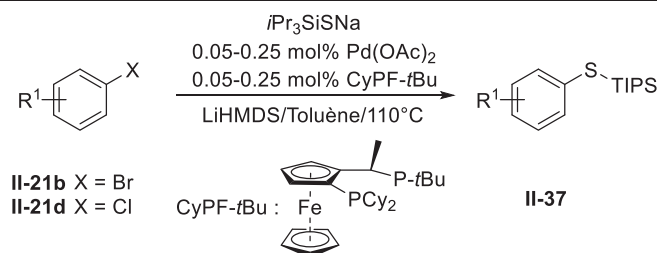


Schéma 16 : Insertion pallado-catalysée du groupement TIPS-S.

Le spectre de la réaction a montré la grande tolérance fonctionnelle de cette dernière. Elle fonctionne avec tout type de substituant (CN, OMe, CH₂OH) ; des dérivés benzéniques, naphtaléniques ou thiophène et les rendements obtenus sont > 90%. C'est aussi une des rares méthodes permettant l'emploi des chlorures d'aryle **II-21d**.

II.2.3. Thiolation par lithiation

Une autre voie de synthèse classiquement utilisée implique des réactifs lithiés. Ceux-ci sont obtenus par échange halogène métal entre l'halogénure d'aryle et le butyllithium. L'aryl lithium **II-41** obtenu réagit ensuite avec un électrophile (S₈) pour donner **II-42** (Schéma 17).¹⁴⁷

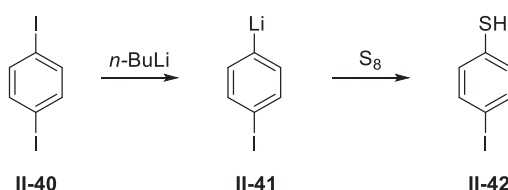


Schéma 17 : Echange halogène-lithium puis thiolation

Cette méthode est efficace mais comporte de sérieuses limitations. De plus, la réaction n'est pas chimiosélective et de nombreux groupements fonctionnels ne tolèrent pas la présence des organolithiens, notamment les dérivés carbonylés.

II.2.4. La réaction de Grignard

Une alternative à la lithiation est l'utilisation de la réaction de Grignard. Grunwell s'est intéressé à la réaction de S_N2 entre un bromure de phényl magnésium **II-43** et le disulfure de méthaneuram **II-44**, menant au dithiocarbamate **II-45** (Schéma 18).¹⁴⁸

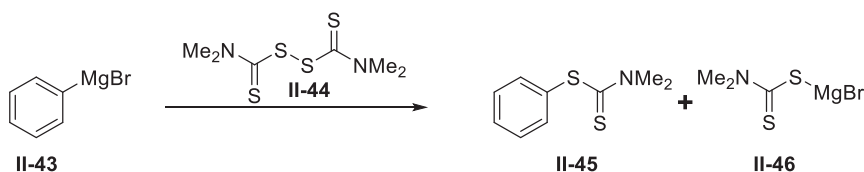


Schéma 18 : Formation d'un dithiocarbamate par réaction de Grignard

Une exemplification de la réaction avec des alkyl magnésiens a démontré leur meilleure réactivité. Le dithiocarbamate **II-45** formé peut ensuite être facilement réduit en thiol avec

LiAlH_4 . Les rendements obtenus restent néanmoins faibles variant entre 26 et 71% et le spectre de la réaction est limité.

II.2.5. La substitution nucléophile aromatique

La Substitution Nucléophile Aromatique ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) est la première méthode utilisée pour introduire des motifs soufrés sur un noyau aromatique. La première application de cette méthodologie revient à l'allemand Rudolf Leuckart.¹⁴⁹ En partant d'un sel de phényldiazonium **II-47**, l'ajout d'un *O*-alkyl xanthate permet via un mécanisme de $\text{S}_{\text{N}}1$ d'obtenir le *S*-aryl xanthate **II-48** (Schéma 19)

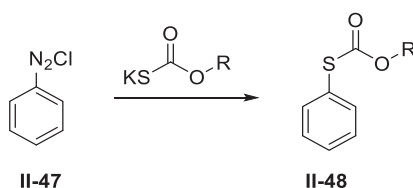


Schéma 19 : Synthèse d'aryl xanthate à partir d'un sel de diazonium

Cette méthodologie a été appliquée de nombreuses années plus tard aux halogénures d'aryles. La simple génération d'un thiolate *in situ* en présence du perhalogénobenzène **II-49** dans un solvant polaire conduit à la substitution nucléophile sur toutes les positions i.e, à la formation de l'hexathioéther **II-50** à température ambiante avec un rendement de 95% (Schéma 20).¹⁵⁰

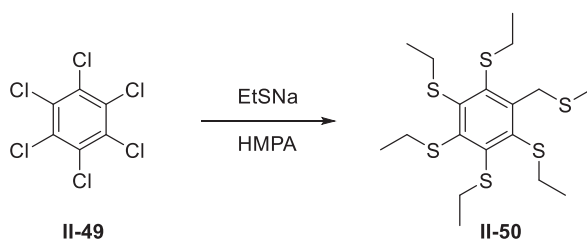


Schéma 20 : $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ de l'éthanethiolate de sodium sur l'hexachlorobenzène

Récemment, le groupe de Stefan Matile a utilisé cette voie de synthèse pour accéder à des motifs naphthalène porteurs de deux groupements thioéther.¹⁵¹ Cette méthode possède de nombreux avantages mais reste limitée car seuls les thiolates fortement nucléophiles peuvent réagir efficacement en $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$. Par ailleurs, les thioéthers générés ne sont pour la plupart pas déprotégeables en thiols libres. Une exception notable est le groupement SMe qui peut être transformé en thiol libre par la réaction de Pummerer.

II.2.5.1. Réaction de Pummerer

La réaction de Pummerer a initialement été utilisée pour générer des α -acyloxy-thioéthers (**II-53**).¹⁵² Toutefois, il a depuis été démontré que leur traitement basique conduisait à la formation de thiols libres (Schéma 21).

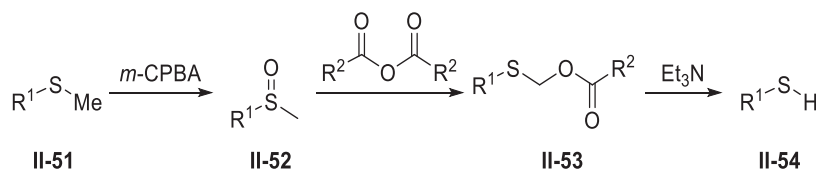


Schéma 21 : Formation d'un thiol à partir de SMe via la réaction de Pummerer.

Ainsi, la succession de trois étapes : (1) oxydation du thioéther (**II-51**) en sulfoxyde(**II-52**) avec le *m*-CPBA, (2) ajout d'un anhydride (acétique où trifluoroacétique) formant l' α -acyloxythioéther **II-53** et (3) traitement basique à la triéthylamine, mène au thiol désiré **II-54**. Cette méthode est efficace mais son rendement global est généralement assez faible (~50%). De plus, aucune application d'une double réaction de Pummerer pour générer un dithiophénol n'est donnée dans la littérature.

II.2.5.2. Alternative à la réaction de Pummerer

Une alternative à la réaction de Pummerer a été développée par Gringras *et coll.*¹⁵³ Leur stratégie exploite la différence de réactivité entre les thioéthers d'aryle et de méthyle. Il est en effet possible de déprotéger sélectivement le groupement thioéther de méthyle **II-55** pour générer le thiol **II-56** correspondant sans affecter la jonction entre les deux noyaux (Schéma 22).

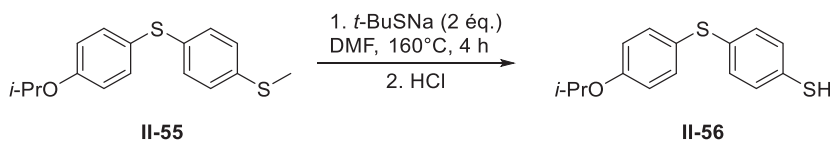


Schéma 22 : Déprotection sélective d'un thioéther de méthyle

Plusieurs alkylethiolates de sodium (MeSNa, *i*-PrSNa, *t*-BuSNa) ont été testés pour la déprotection à chaud de **II-55** dans le DMF. Après optimisation, le *tert*-butylthiolate de sodium s'est révélé le plus efficace pour mener à bien la réaction avec des rendements supérieurs à 90%.

II.3. SYNTHÈSE DE LA BRIQUE ACIDE 2,5-DIMERCAPTOTEREPHTALIQUE (A)

La première classe de brique moléculaire envisagée pour porter à la fois deux fonctions thiols et deux épitopes saccharidiques dérive de l'acide 2,5-dimercaptotéréphtalique. Sa synthèse et sa cyclooligomérisation ont été optimisées¹²⁰ au laboratoire CSAp lors des travaux de thèse de Pierre-Thomas Skowron, Mélissa Dumartin et Emeric Jeamet.¹²¹

II.3.1. Première voie de synthèse via le 2,5-dimercaptotéréphtalaldéhyde

La première voie synthétique explorée, visant à introduire les épitopes sur les fonctions acides carboxyliques de **II-62**, s'appuie sur les travaux du Dr. Mélissa Dumartin au cours de sa thèse (Schéma 23).

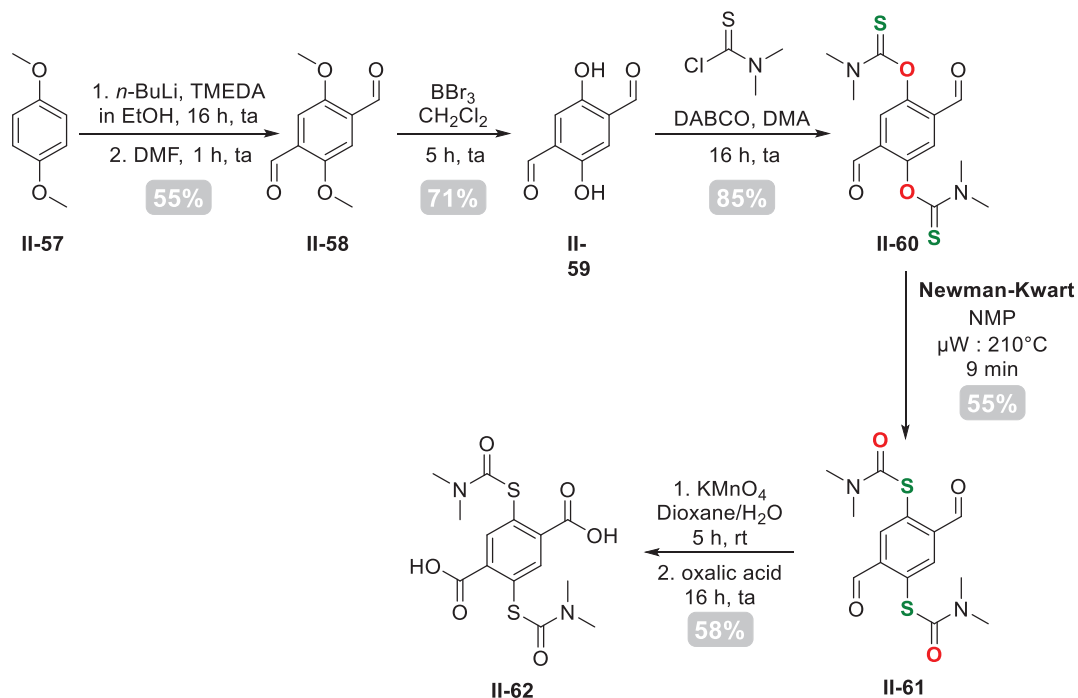


Schéma 23 : Voie de synthèse menant à **II-62** à partir du 1,4-diméthoxybenzène.

La formylation de la brique 1,4-diméthoxybenzène **II-57** conduit au dialdéhyde **II-58**. Puis, BBr₃ est utilisé pour déprotéger les fonctions phénols, générant ainsi l'hydroquinone **II-59** convertie en *O*-thiocarbamate **II-60** par le chlorure de diméthylthiocarbamoyl en présence de DABCO. Une optimisation du réarrangement de Newman-Kwart a montré que le meilleur rendement était obtenu en chauffant le composé **II-60** à 210°C dans la *N*-méthyl-2-pyrrolidone sous irradiation micro-onde. Finalement, le diacide **II-62** est obtenu en oxydant le dialdéhyde **II-61** à l'aide de KMnO₄.

II.3.1.1. Couplage peptidique

La molécule **II-62** présente l'avantage de posséder une structure dithiol protégée par un groupement clivable par saponification, tout comme les acétyles utilisés pour protéger classiquement les épitopes saccharidiques. Les fonctions acides carboxyliques sont directement disponibles pour le couplage avec les espaceurs portant les différents saccharides, par exemple par simple formation d'amide. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'introduction d'un espaceur triéthylèneglycol monosubstitué par un galactose par couplage peptidique (Schéma 24).

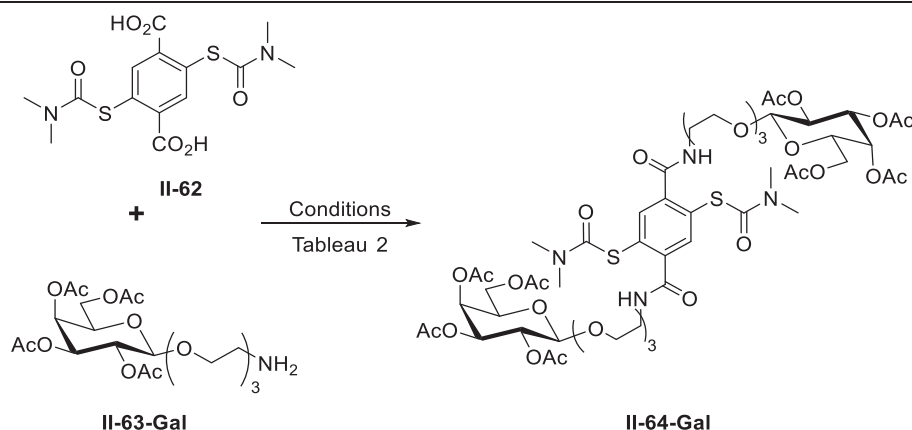


Schéma 24 : Formation du diamide

Après optimisation (Tableau 2), il apparaît clairement que les meilleures conditions pour obtenir le composé **II-64-Gal** sont l'emploi d'un mélange 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) / 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC).

Tableau 2 : Optimisation de la réaction *simili* couplage peptidique

Conditions	Rendement
II-63-Gal + II-62 TBTU, EDC, DIPEA in THF/DMF (1:1, v/v)	Produit de départ
II-122-Gal + II-62 HOBt, DIC, PMe ₃ in THF/DMF (1:1, v/v)	Mélange complexe
II-63-Gal + II-62 TBTU, EDC, DIPEA in THF/DMF (1:1, v/v)	Mélange complexe
propargylamine + II-62 TBTU, EDC, DIPEA in THF/DMF (1:1, v/v)	Mélange complexe
II-63-Gal + II-62 HOBt, EDC, DIPEA in CH ₂ Cl ₂	75%

II.3.1.2. Déprotection du *S*-thiocarbamate

La dernière étape consistait à saponifier les acétyles du saccharide et de déprotéger le *S*-thiocarbamate pour obtenir le thiol libre. Bien que la saponification des acétyles puisse être effectuée à température ambiante, la déprotection du groupement *S*-thiocarbamate nécessite de chauffer. Les premiers essais utilisant KOH dans le diéthylèneglycol à 100°C ont conduit à la dégradation du substrat en diverses espèces possédant ou non des saccharides. L'éthanolate de sodium n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats. En effet, si les groupements acétyles sont facilement saponifiés, une double cyclisation intramoléculaire a lieu entre les amides et les groupements *S*-thiocarbamates pour donner le composé **II-66-Gal** (Schéma 25). Le produit **II-66-Gal** n'a pas été caractérisé en RMN mais identifié formellement en spectrométrie de masse de type electrospray.

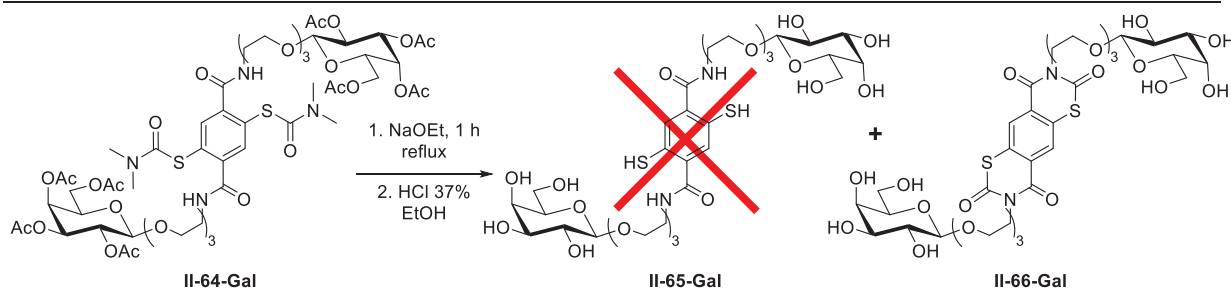


Schéma 25 : Double cyclisation intramoléculaire lors de l'étape de déprotection

Le même type de réaction parasite a été observé au laboratoire par le Dr. Mélissa Dumartin sur le *N,N*-diéthylthiocarbamate **II-67** (Schéma 26). Il apparaît que la présence d'un amide en *ortho* d'un *S*-thiocarbamate entraîne, en milieu basique, la cyclisation intramoléculaire.

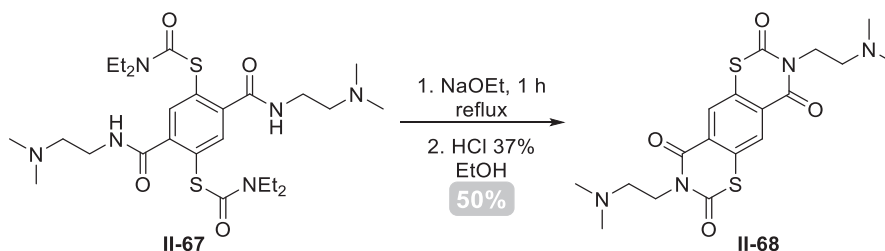


Schéma 26 : Double cyclisation intramoléculaire sur un dérivé *N,N*-diéthylthiocarbamate

II.3.2. Changement de groupement protecteur

L'incompatibilité du groupement protecteur *S*-thiocarbamate avec nos conditions de déprotection nous a conduit à explorer des alternatives. Plusieurs candidats ont été sélectionnés les groupements : trityle, benzyle ou 2-cyanoéthyle (Figure 6).

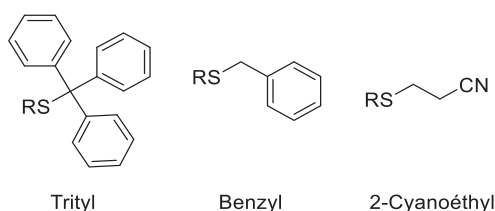


Figure 6 : Groupements envisagés pour la synthèse de l'acide 2,5-dimercaptotéréphthalique protégé.

Le groupement trityl est facilement introduit à partir du chlorure de trityle par simple réaction de S_N2 en présence d'un thiolate. Néanmoins, sa résistance aux conditions basiques ne permet pas d'envisager une déprotection concomitante avec les acétyles du saccharide. De plus, c'est un groupement fortement encombrant qui, en *ortho* des acides carboxyliques, risque de limiter leur réactivité. Enfin, les conditions fortement acides nécessaires à sa déprotection peuvent poser des problèmes au niveau du saccharide dont le lien glycosidique de type acétal est potentiellement labile en milieu acide.

Le groupement benzyle est un bon substitut au trityle car la gêne stérique occasionnée est moindre. Comme le trityle, il est très facile de l'introduire par une réaction de S_N2 mais il est aussi possible d'incorporer directement le motif thiol protégé via une réaction de S_NAr du

benzylthiolate sur un noyau aromatique activé. Toutefois, les conditions de Birch ($\text{Na}/\text{NH}_3(\text{liq})$) nécessaires à sa déprotection est susceptible de dégrader les noyaux aromatiques de nos composés.

Le dernier groupement étudié est moins répandu mais répond à notre cahier des charges. En effet, le groupement 2-cyanoéthyle a l'avantage d'être peu encombrant et d'être déprotégé en conditions basiques douces comme les acétyles. De plus, sa structure ne laisse pas présager de réaction de cyclisation intramoléculaire.

D'autres groupements protecteurs tels le-2-triméthylsilyléthylsilane ou l'acétyle sont décrits et auraient pu faire l'objet d'étude de notre part. Toutefois, les caractéristiques du 2-cyanoéthyle en ont fait le groupement protecteur choisi pour la suite de notre synthèse.

II.3.3. Deuxième voie de synthèse via l'acide 2,5-dimercaptotéréphthalique

La nouvelle voie de synthèse fondée sur l'introduction du groupement 2-cyanoéthyle reprend les travaux de Vial *et al.*¹²⁰ En suivant leur mode opératoire et en partant du 2,5-dihydroxytéréphthalate de diéthyle **II-69**, les réactions successives de thiocarbamatation, de réarrangement de Newman-Kwart et de saponification permettent d'obtenir le composé **II-72** avec un rendement de 70% sur 3 étapes (Schéma 27).

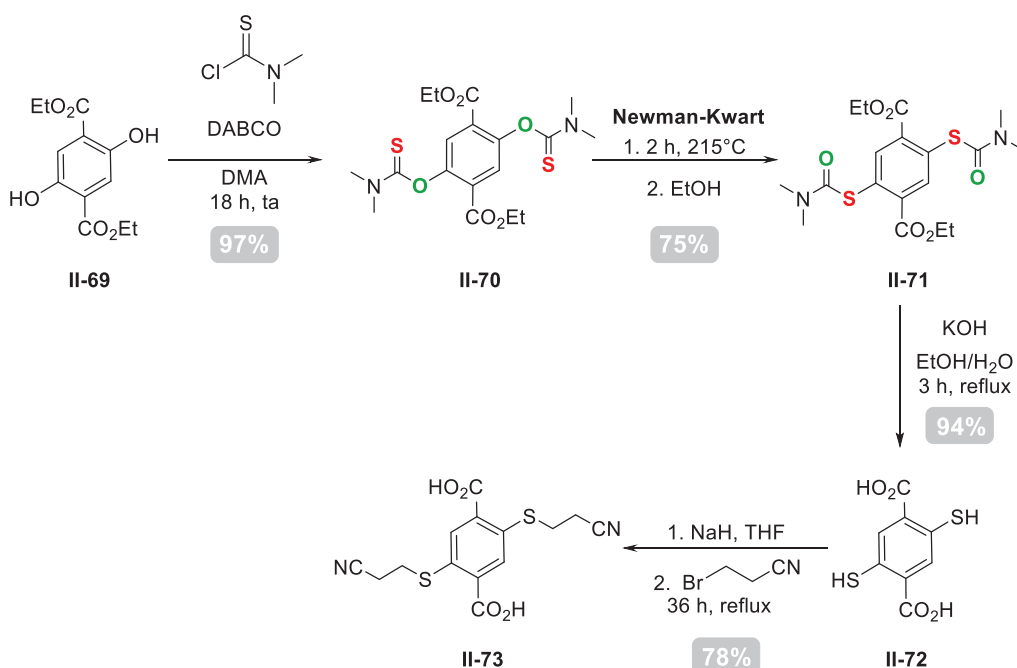


Schéma 27 : Voie de synthèse pour obtenir le composé **II-73** protégé par un groupement 2-cyanoéthyle

II.3.3.1. Introduction du groupement protecteur 2-cyanoéthyle

Suivant une méthodologie développée par Belle *et al.*,¹⁵⁴ l'introduction du groupement protecteur fut effectuée via l'utilisation du 3-bromopropionitrile et de l'hydrure de sodium en présence de **II-72** sous conditions anaérobiques pour éviter toute formation de ponts disulfures.

Après optimisation, il fut observé qu'une quantité importante de 3-bromopropionitrile était nécessaire (20 éq.) pour obtenir un rendement satisfaisant. Toutefois, ceci entraînait la formation de sels en quantité importante et une optimisation de la purification a été nécessaire pour obtenir un produit apte à être engagé dans la réaction suivante. Le produit **II-73** est ainsi isolé à l'échelle du gramme sous forme de précipité jaune vif via plusieurs filtrations successives sur membranes hydrophile et hydrophobe.

II.3.3.2. Couplage peptidique

En présence de HOBt et EDC, la formation des liens amides entre **II-73** et l'espèce galactosylée **II-63-Gal** permettait l'obtention de l'espèce **II-74-Gal**. Néanmoins, la formation d'un sous-produit *N*-acétylé **II-75-Gal** (Schéma 28) résultant de l'attaque de l'amine sur un des acétyles du saccharide et possédant la même polarité que notre molécule a posé de nombreux soucis de purification et entraîné des chutes de rendement lors du passage sur grande quantité.

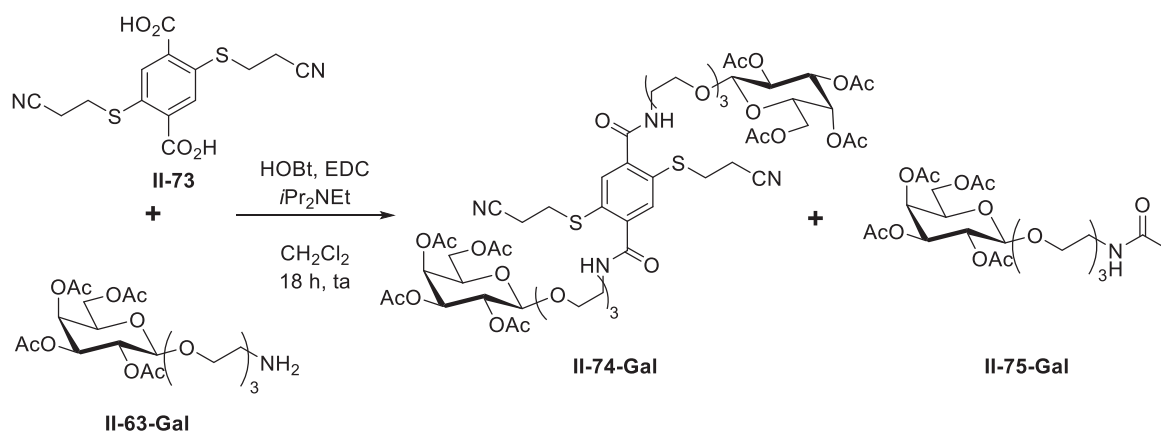


Schéma 28 : Formation du *N*-acétyl **II-75-Gal** lors de la formation de l'amide **II-74-Gal**

Nous verrons que la formation du composé **II-75-Gal** a déjà lieu lors de la réduction en amine du précurseur azidé (Chapitre 1, II.6.5). Pour contrer cela, des changements furent apportés à la synthèse du saccharide et l'utilisation de HCTU fut privilégiée pour sa plus grande réactivité permettant d'éviter la formation lente mais continue du sous-produit. De plus, des tests ont montré que la tétraméthyl urée restante s'enlevait facilement lors de la dernière étape de la synthèse permettant de limiter les pertes de rendements dues aux nombreuses extractions (10 minimum) nécessaires pour l'enlever totalement.

II.3.3.3. Obtention des briques moléculaires dérivées de A

L'étape finale consistait en la déprotection simultanée des acétyles et du groupement 2-cyanoéthyle (Schéma 29). L'emploi de CsOH (20 éq.) dans une solution MeOH/THF (1:1, v/v) permet l'obtention en 3 h du produit désiré **II-76**.¹⁵⁵ Après ajustement à pH = 4, le solvant fut évaporé et les sels de césium ainsi que la tétraméthyle urée restante furent retirés via chromatographie en phase inverse C18 et le produit **II-78** obtenu par lyophilisation. Le rendement de cette dernière étape oscille entre 55 et 65% en fonction du saccharide utilisé.

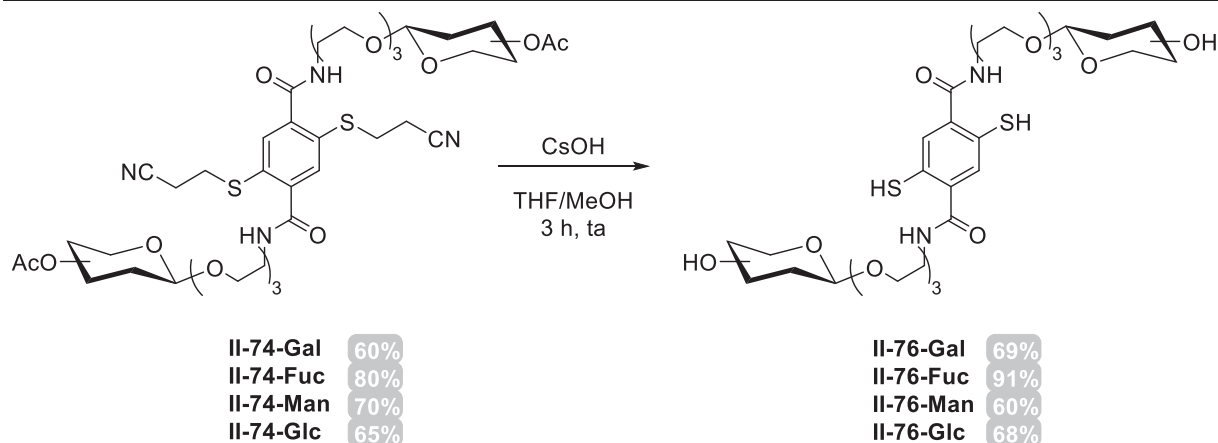


Schéma 29 : Déprotection des thiols et saponification concomitante des acétyles pour l'obtention des briques moléculaires **II-76**

Ainsi, les 4 premières briques moléculaires (**II-76-Gal**, **II-76-Fuc**, **II-76-Man**, **II-76-Glc**) ont pu être synthétisées et leur étude en CCD a été menée.

L'objectif de cette thèse étant de découvrir des nouveaux inhibiteurs de LecA et LecB, il était nécessaire de déterminer les affinités de nos composés pour ces dernières. Pour cela, notre choix s'est porté sur l'ITC comme technique d'analyse. Dans le cadre de ces études ITC, nous avons souhaité vérifier l'impact de l'espaceur et des thiols sur l'affinité. Des synthèses sont actuellement en cours pour avoir accès à des motifs permettant l'étude de ces influences.

Pour obtenir des informations thermodynamiques sur nos briques monomériques, nous avons décidé de synthétiser des molécules ne pouvant pas oligomériser (absence de thiol) à partir de l'acide téréphthalique. Les divers composés saccharidiques **II-79** ont été synthétisés en employant HCTU comme agent de couplage (Schéma 30) et les saccharides **II-78** dont les synthèses seront décrites en partie (Chapitre 1, II.6.6). Comme pour les composés **II-76**, la saponification des acétyles a lieu avec CsOH dans un mélange THF/MeOH (1:1 v/v).

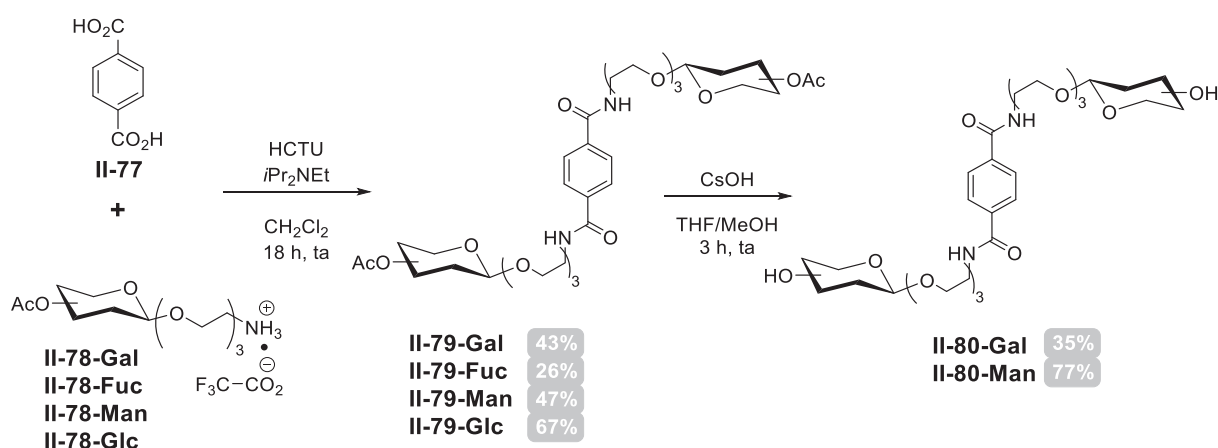


Schéma 30 : Formation des composés **II-80** issus de l'acide téréphthalique

Pour vérifier l'influence du soufre, des briques di-SMe-téréphthalamide ont été envisagées. La méthylation des thiols et des acides carboxyliques du composé **II-72** a donné le diester **II-81** (Schéma 31). Ce dernier a été saponifié pour restaurer le diacide **II-82**. Selon la méthodologie

Pour circonvenir à ce problème, nous avons étendu la chaîne portée par l'azote de l'amide avec un groupement éthylèneglycol. La solubilité observée étant bien meilleure, les thiols du composé **II-85** ont été déprotégés pour donner la molécule **II-86** qui a été étudiée en CCD.

II.4. SYNTHÈSE DE LA BRIQUE ACIDE 2,5-DIMERCAPTOBENZOÏQUE B

La brique **B** étant extrêmement similaire à la brique **A**, la synthèse en tant que telle ne diffère quasiment pas. Les trois premières étapes sont décrites par Lawson *et al* (Schéma 33).¹⁵⁶

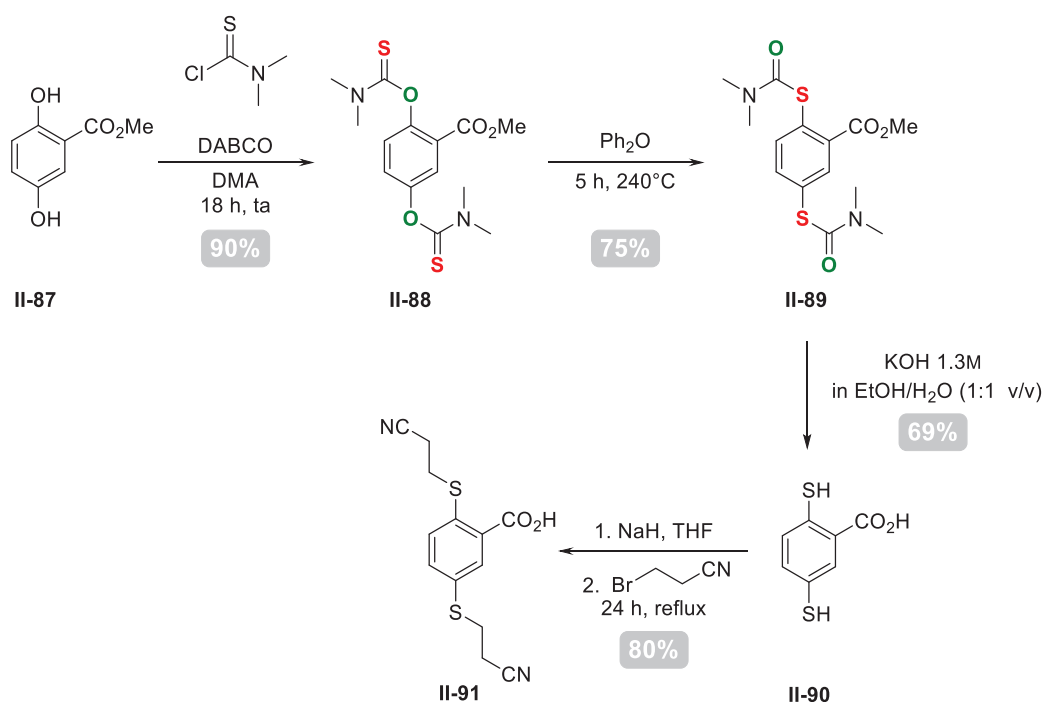


Schéma 33 : Voie de synthèse de la brique monovalente **B**

Encore une fois, elles se composent de la formation du *O*-thiocarbamate **II-88** à partir de la brique hydroquinone de départ **II-87**, puis d'un réarrangement de Newman-Kwart dans le diphenyl éther à 240°C. Un chauffage plus fort à la limite de la dégradation du composé s'est avéré nécessaire car le *O*-thiocarbamate en *mé*ta de l'ester n'est pas activé. Enfin, la saponification de l'ester et la déprotection des *S*-thiocarbamates est obtenue en chauffant le produit **II-90** dans une solution aqueuse de KOH. Suivant la méthodologie utilisée pour la brique **A**, les thiols sont protégés par des groupements 2-cyanoéthyles pour obtenir le composé **II-91**.

Divers tests pour la formation de l'amide entre le produit **II-91** et les divers saccharides **II-78** ont été effectués. Cette fois-ci, la simplicité de purification (hormis la présence de tétraméthyle urée) issue de la réaction avec HCTU a permis d'obtenir des rendements bien supérieurs à ceux en présence de HOBt et EDC (non-présentés ici). De plus, l'utilisation de l'ammonium **II-78** a permis d'éviter l'obtention du composé *N*-acétyl **II-75**. La dernière étape impliquant la déprotection en milieu anaérobie des acétyles et du 2-cyanoéthyle s'est avérée plus

problématique due à la tendance du produit à précipiter en cours de réaction. Néanmoins, l'ajout d'une quantité plus importante de méthanol a permis de mener la réaction à son terme avec des rendements supérieurs à 90% (Schéma 34).

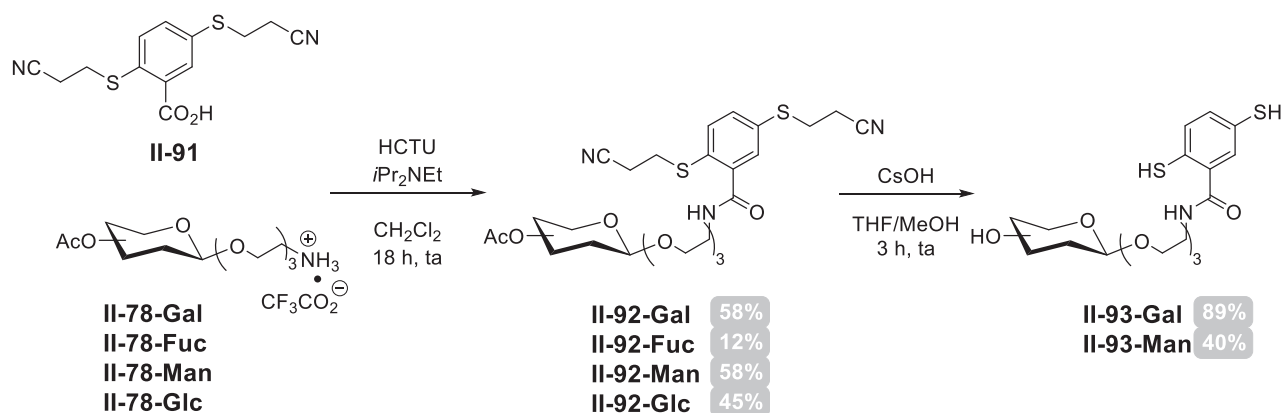


Schéma 34 : Synthèse des briques monovalentes **II-93**

La synthèse de ces quatre briques monovalentes, pendants des différentes briques divalentes issues de **A** a permis de lancer l'étude de chimiothèques mixtes en CCD avec des valences paires ou impaires. De plus, les objets moléculaires issus de l'autoassemblage de cette brique se rapprochent des molécules de type calix[4]arène et pillar[5]arène dont la forte affinité pour LecA et LecB a déjà été établie.^{34,35,49,50} Enfin, l'étude de l'intermédiaire **II-90** en CCD a aussi été entreprise par deux autres doctorants du laboratoire, Alexandre Heloin et Fanny Demontrond, pour étudier ses propriétés de reconnaissance supramoléculaire. En effet, cette molécule est le pendant monovalent des diacides développées par Vial *et al*¹²⁰ comme récepteur de la spermine.

Similairement à la brique **A**, des molécules étudiant l'influence des atomes de soufre et de l'espaceur ont été synthétisées. La version acide di-SMe-benzoïque **II-95** (Schéma 35) a été synthétisée suivant une réaction de méthylation du composé **II-90** puis saponification de l'ester de **II-94**.

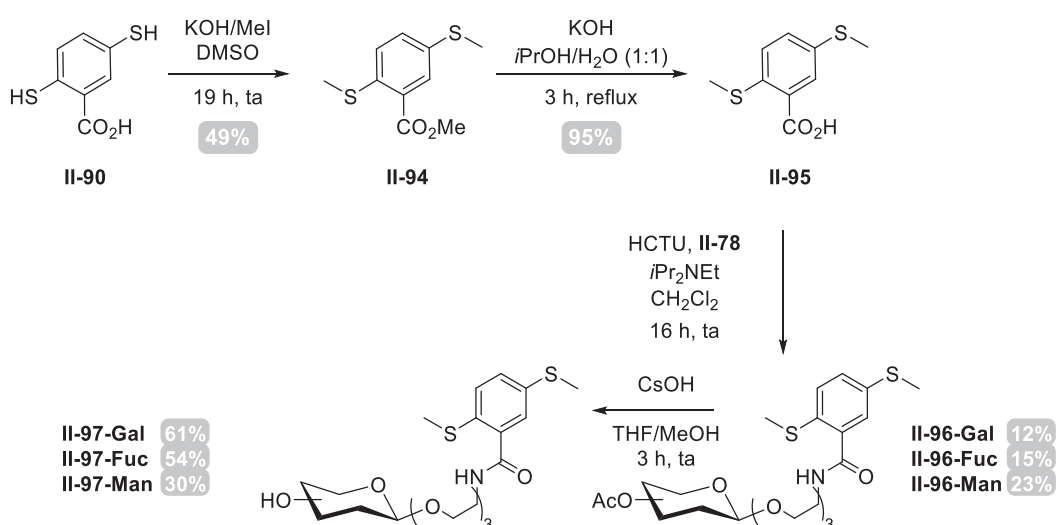


Schéma 35 : Synthèse des composés **II-97** pour les études en ITC

Les quatres monosaccharides ont été greffés via la formation d'un lien amide en présence de HCTU pour donner les composés **II-96**. Les rendements obtenus se sont révélés faibles car le produit de départ **II-95** s'est révélé peu réactif et les nombreuses extractions nécessaires pour enlever la tétraméthyl urée et caractériser le produit final ont fait chuter le rendement. Toutefois, la TMU étant enlevée dans l'étape de lavage de la déprotection, ces chutes de rendements ne seront plus observées lors de la répétition de l'expérience. La déprotection des acétyles a été effectuée en présence de CsOH et a donnée les composés monovalents **II-97** pour les études en ITC

II.5. SYNTHESE DE LA BRIQUE NAPHTALENE DIIMIDE C

La brique naphtalène apporte une autre conformation aux objets moléculaires créés. De plus, son noyau aromatique en cas de formation de macrocycle permet d'imaginer des récepteurs moléculaires possédant une plus grande cavité centrale. La synthèse de cette brique implique l'introduction d'un motif dithiol en positions 2,6 du naphtalène mais aussi de deux diimide sur les positions 1,8 et 4,5. Les molécules développées dans l'équipe de Stefan Matile comportent des motifs soufrés mais ces derniers ne sont pas aisément déprotégeables puisqu'il s'agit de thioéther d'éthyl,¹⁵⁷ d'aminoéthyl,¹⁵⁸ d'aryl¹⁵⁹ ou d'adamantyl.¹⁶⁰ Néanmoins, nous nous sommes appuyés sur ces travaux pour développer notre synthèse.

II.5.1. Bromation du noyau naphtalène dianhydride

En guise de point de départ, nous avons choisi le dianhydride naphtalène-1,4,5,8-tétracarboxylique **II-98**. La première étape de bromation avec Br₂ chauffé en présence de **II-98** dans un oléum H₂SO₄ / 20-30% SO₃ libre et en présence de diiode catalytique génère les divers intermédiaires (poly)bromés dont seul **II-99c** nous intéresse (Schéma 36).

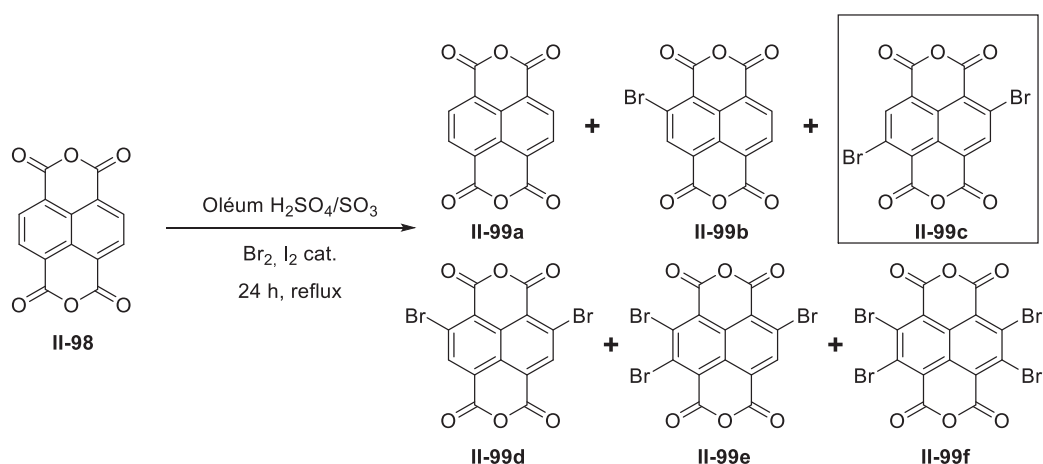


Schéma 36 : Bromation non-sélective du dianhydride **II-98**

Pour cette étape, nous nous sommes inspirés d'une publication de Reczek *et coll* décrivant une optimisation de la réaction via un suivi cinétique par RMN du proton de la bromation.¹⁶¹ Leur rendement RMN était grandement supérieur à ceux des autres groupes. Toutefois, ils ne prenaient pas en compte la formation du produit tétrabromé ou aucun proton n'est présent et qui d'après nos résultats représente entre 25 et 30% du total des espèces formées.

II.5.2. Purification des composés (poly)bromés

Une purification à ce stade n'étant pas possible, deux solutions étaient envisageables et décrites dans la littérature : former un tétraester ou former un diimide et purifier par colonne de silice.^{151,161} Etant donné la difficulté de produire nos dérivés saccharidiques, nous avons envisagé de former le diimide issu de l'addition de la propargylamine. Toutefois, la purification de cette réaction n'a pu être menée dû à la non-solubilité des espèces formées. La formation du tétraester d'éthyle étant décrite par Matile en présence d'iodure d'éthyle,¹⁵¹ sa synthèse a été entreprise permettant d'obtenir après plusieurs chromatographies le composé **II-100** avec un rendement de 23% sur deux étapes (Schéma 37).

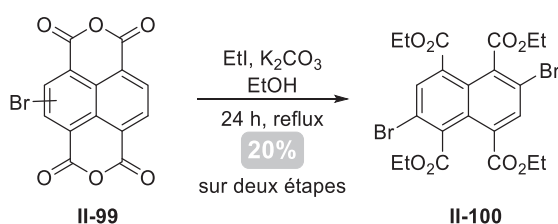


Schéma 37 : Formation du tétraester **II-100**

Deux voies de synthèse étaient alors envisageables pour introduire le thiol. La première passait par un schéma classique déjà décrit sur les deux précédentes synthèses avec comme étape clé le réarrangement de Newman-Kwart. La deuxième, plus élégante, utilisait la $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ pour introduire directement le thiol protégé. Nous avons cherché à développer les deux voies de synthèses en parallèle.

II.5.3. Voie Newman-Kwart

Après isolement de la molécule **II-100**, l'objectif de la voie Newman-Kwart était de substituer les bromes par des groupements *O*-thiocarbamates. Pour cela, une réaction de type $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ avec un alcoolate d'alkyle permettait d'introduire l'atome d'oxygène nécessaire à la suite de la synthèse. Bien que moins nucléophile que les thiolates, les alcoolates d'alkyle sont capables d'effectuer une $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ et ont l'avantage d'être facilement déprotégeables. En utilisant de l'éthanolate de sodium fraîchement préparé et en suivant un mode opératoire décrit par le groupe de Matile,¹⁵¹ le composé **II-101** fut obtenu avec un rendement de 55% (Schéma 38). Une déprotection des fonctions éthoxy en présence de BBr_3 permet l'obtention du dérivé hydronaphtoquinone **II-103** sans observation de la possible naphtoquinone (analyses RMN et MS).

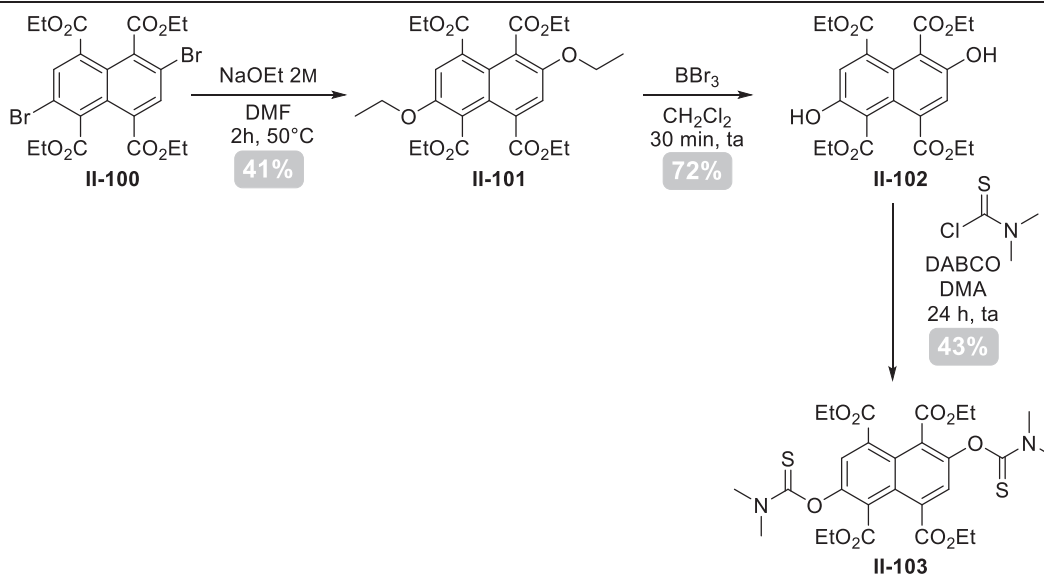


Schéma 38 : Voie de synthèse pour obtenir le *O*-thiocarbamate **II-103**

Une fois l'hydronaphtoquinone **II-102** obtenue, la formation du *O*-thiocarbamate **II-103** fut entreprise. Cependant, les conditions classiquement utilisées jusqu'alors pour former ce dernier (DABCO/DMA) ne donnèrent pas le produit désiré. Le suivi CCM de la réaction ne révéla que le produit de départ. Un changement de base pour NaH fut nécessaire pour enclencher la réaction et plusieurs équivalents par fonction hydroxyle furent nécessaires pour obtenir le *O*-thiocarbamate **II-103** désiré. La suite de la synthèse impliquait de faire le réarrangement de Newman-Kwart. Toutefois, les rendements des dernières étapes étant faibles (12.5% sur trois étapes), la quantité de produit amené à ce stade de la synthèse se révéla trop restreinte (30 mg) pour faire le réarrangement. De plus, il est très souvent nécessaire d'optimiser cette réaction et cela implique une quantité assez importante de produit de départ qu'il semblait difficile d'atteindre avec un rendement global de 3% sur les 5 premières étapes de synthèse. La voie Newman-Kwart ne fut donc pas poussée plus avant et une analyse beaucoup plus extensive fut consacrée à la deuxième voie de synthèse.

II.5.4. Voie S_NAr par un thiolate

II.5.4.1. Optimisation de la réaction de S_NAr

La synthèse utilisant la S_NAr par un thiolate est plus élégante car elle résume en une seule étape ce qui en demande quatre dans la voie Newman-Kwart. La méthodologie développée par le groupe de Matile emploie un excès significatif (100 éq.) d'éthanethiol en présence d'une base (K₂CO₃) et d'un éther couronne (18C6) (Schéma 39).¹⁵⁷

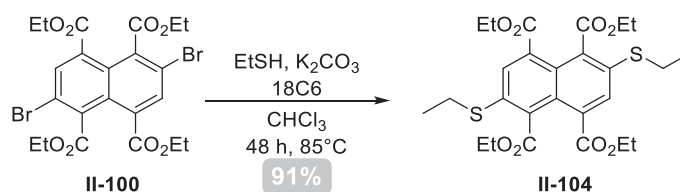


Schéma 39 : Introduction du groupement SEt via S_NAr

La réaction est chauffée en tube scellé au-delà du point d'ébullition du chloroforme et permet d'obtenir le composé **II-104** avec un rendement quasiment quantitatif.

Après avoir répété précisément la synthèse décrite par Matile avec l'éthanethiol, nous avons décidé d'introduire des groupements susceptibles d'être déprotégés pour générer le thiol libre. Notre choix s'est dans un premier temps arrêté sur le méthane-thiolate de sodium (Schéma 40).

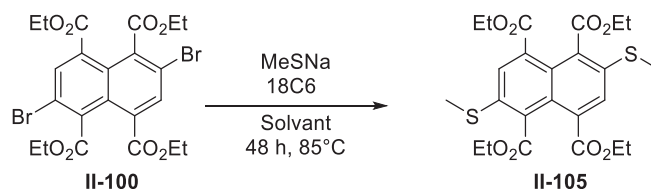


Schéma 40 : Application de la méthodologie de Matile¹⁵¹ au méthane-thiolate de sodium

L'introduction d'un groupement SMe nous permettait d'envisager une double réaction de Pummerer pour obtenir le dithiol désiré. Après deux premiers tests non concluant (Tableau 3, Entrées 1-2) dans les conditions décrites par Matile, un changement de solvant nous a permis d'obtenir le produit désiré (Entrée 3). Nous avons tenté d'optimiser la réaction en diminuant les quantités de thiol (Entrée 4). Les résultats exposés dans le tableau 3 montrent que la quantité de thiol peut être divisée par 5 (Entrée 4) et que la présence de l'éther couronne n'est pas nécessaire (Entrée 5).

Tableau 3 : Optimisation de la réaction de S_NAr pour MeSNa^a

Entrée	MeSNa (éq.)	18C6 (éq.)	Solvant	Temps (h)	Rendement
1	20	0.1	CHCl ₃	48	< 10%
2	100	1	CHCl ₃	48	< 10%
3	100	1	CHCl ₃ /DMF (1:1, v/v)	72	70%
4	20	0.1	CHCl ₃ /DMF(1:1, v/v)	48	63%
5	20	0	CHCl ₃ /DMF (1:1, v/v)	48	70%

^a Dibromo **II-100** (50 mg, 1 éq.) dans 5 mL de solvant, 85°C, 48 h.

II.5.4.2. Déprotection via réaction de Pummerer

En parallèle, nous avons mené une étude sur la réaction de Pummerer grâce à la brique **II-81** synthétisée par méthylation de la brique **II-72**. Cette molécule a l'avantage de porter les mêmes groupements fonctionnels (esters) que la brique naphthalène et est beaucoup plus accessible ce qui nous permet d'économiser cette dernière dont la synthèse reste difficile dû à l'emploi en grande quantité d'oléum. La première étape d'oxydation du soufre en sulfoxyde via le *m*-CPBA en léger défaut nous a permis d'obtenir après purification le composé **II-106** désiré (Schéma 41). Toutefois, l'ajout d'anhydride trifluoroacétique n'a pas permis d'obtenir l' α -acyloxy-thioéther **II-107** désiré. Un retour en arrière avec la désoxygénation du soufre a été observé en

RMN ainsi que l'apparition de plusieurs autres produits dont aucune masse ne correspond au produit désiré. En se fondant sur les faibles rendements obtenus dans la littérature et sur nos résultats, l'idée d'utiliser une double réaction de Pummerer pour former le dithiol libre sur la brique naphthalène a été écartée.

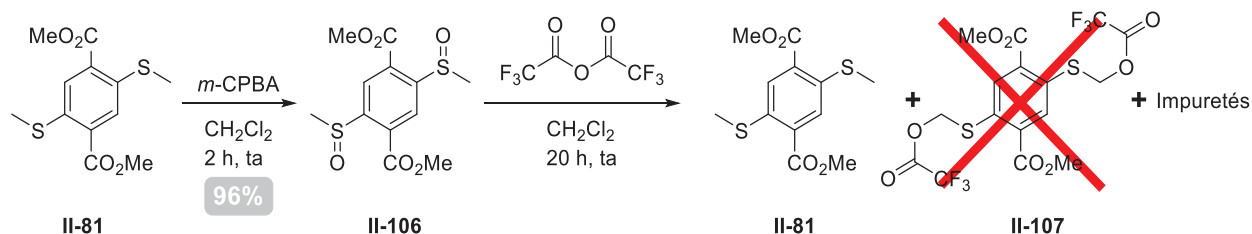


Schéma 41 : Tentative de synthèse d'une brique dithiolée via la réaction de Pummerer

II.5.4.3. Exemplification de la réaction de S_NAr

La formation des naphthalènes di-SEt **II-104** (Entrée 6) et di-SMe **II-105** (Entrée 7) ne nous permettant pas d'atteindre la formation du dithiol désiré, nous avons exemplifié la réaction de S_NAr avec diverses espèces thiolées susceptibles d'être déprotégées (Tableau 4). En suivant le protocole de Matile aucun résultat concluant n'a été obtenu. En effet, le dérivé xanthogénate (Entrée 8) génère le produit di-SEt **II-104** ; le thioacétate (Entrée 9) une myriade d'espèces ; la thiourée (Entrée 10) un mélange impossible à purifier ou aucune masse ne correspond au produit désiré ; le soufre élémentaire (Entrée 11) donne seulement le produit de départ et le groupement TIPS-SH (Entrée 12) amène à un mélange d'espèce issues d'une déhalogénéation partielle, de la perte du groupement TIPS et de l'oligomérisation partielle des thiols aromatiques générés. Enfin, le thiosulfate de sodium (Entrée 13) n'est pas réactif et le produit de départ est récupéré.

Tableau 4 : Introduction de divers motifs thiolés via S_NAr ^a

	Thiol	Rendement	Produit obtenu
6	EtSH	85%	Produit pur : II-104
7	MeSNa ^b	70%	Produit pur : II-105
8	Xanthogénate d'éthyl	37%	Produit di-SEt II-104
9	Thioacétate de potassium ^b	0%	Multiples espèces
10	Thiourée	0%	Espèces non-séparables
11	S ₈	0%	Produit de départ II-100
12	TIPS-SH	0%	Déhalogénéation+ perte du TIPS
13	Thiosulfate de sodium ^b	0%	Produit de départ II-100

^a Dibromo **II-100** (50 mg, 1 éq.), Thiol (100 éq), K₂CO₃ (20 éq) dans CHCl₃/DMF (5 mL, 1:1 v/v), 85°C, 48 h. ^b Sans K₂CO₃

II.5.4.4. Introduction du groupement protecteur cyanoéthyle via S_NAr

II.5.4.4.1 Optimisation de la réaction de S_NAr du cyanoéthyle

Devant ces résultats en partie décevants, nous avons décidé d'introduire notre groupement protecteur 2-cyanoéthyle directement via la S_NAr du groupement mercaptopropionitrile (Schéma 42).

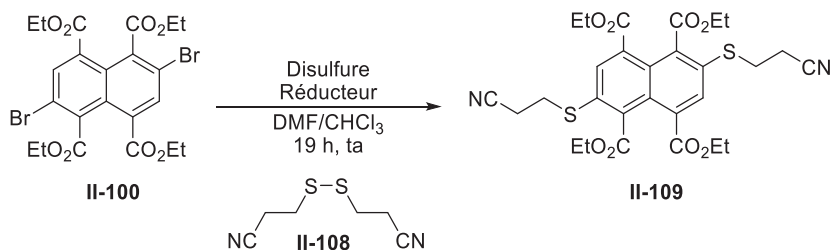


Schéma 42 : Formation du naphthalène di-S-2-cyanoéthyl **II-109**

Néanmoins, le produit lui-même n'étant pas stable, nous avons été contraints d'utiliser sa version disulfure : le 3,3'-dithiobis(propionitrile) **II-98** (Tableau 5). Une première expérience (Entrée 14) nous a montré la non réactivité de notre molécule en l'absence d'agent réducteur de la liaison disulfure. Après ajout de DMF et en chauffant en tube scellé pendant 48 h (Entrée 15), une disparition de l'espèce de départ est observée. Une analyse par spectrométrie de masse a permis de déterminer la disparition de toute espèce bromée même si les molécules formées ne correspondaient pas au produit désiré.

Tableau 5 : Optimisation de la réduction de S_NAr avec le groupement mercaptopropionitrile^a

Entrée	II-108 (<i>éq.</i>)	Agent réducteur	T (°C)	Temps (h)	Rendement
14	50	Aucun	85	48	Produit de départ II-100
15	50	NaBH ₄ (50 <i>éq.</i>)	85	48	0% (réduction CN)
16	50	NaBH ₄ (8 <i>éq.</i>)	85	48	Trace produit + réduction partielle
17	50	NaBH ₄ (8 <i>éq.</i>)	25	48	Produit (30%) + réduction partielle
18	50	Na ₂ S ₂ O ₃ (50 <i>éq.</i>)	25	72	Produit de départ II-100
19	1.2	TCEP (1.1 <i>éq.</i>)	25	48	60%
20	50	PPh ₃ (100 <i>éq.</i>)	25	24	59%
21	50	Irradiation 365 nm	25	72	Déhalogénéation
22	50	DTT (50 <i>éq.</i>)	25	1	90%
23	1.3	DTT (1.4 <i>éq.</i>)	25	120	75%
24 ^b	1.1	DTT (1.2 <i>éq.</i>)	25	24	0%

^a Dibromo **II-100** (1 *éq.*), K₂CO₃ (2 *éq.* par *éq.* of thiol) dans CHCl₃/DMF (5 mL pour 50 mg de **II-100**, 1:1 v/v). ^b Sans K₂CO₃

En s'appuyant sur ces analyses et l'observation de différences de masse $m/z = 2 ; 4 ; 6 ; 8$ Da par rapport à celle attendue, nous avons supposé une réduction partielle de la liaison CN en imine et amine. L'expérience a été répétée avec NaBH₄ en quantité sous-stœchiométrique par

rapport au disulfure (Entrée 16) et le produit désiré **II-109** a pu être observé en mélange avec des espèces issues de la réduction des nitriles. Un suivi cinétique par CCM à température ambiante a été effectué (Entrée 17) et la disparition totale de l'espèce de départ a été observée après une heure de réaction seulement. L'identification des différentes espèces formées a révélé la présence du produit désiré **II-109**, de celui issu d'une mono-substitution et de traces de produit provenant de la réduction du nitrile.

Pour circonvenir à ce problème, diverses molécules permettant de réduire la liaison disulfure ont été investiguées. Si $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ne donne que le produit de départ (Entrée 18), le TCEP (Entrée 19), agent de réduction classique des ponts disulfures des protéines donne de bons résultats mais reste couteux. La triphénylphosphine fonctionne aussi (Entrée 20) mais nécessite de nombreux ajouts successifs pour obtenir le produit désiré. Une irradiation sous lampe UV (18 W, $\lambda = 365$ nm) n'a mené qu'à la déhalogénéation de notre composé de départ (Entrée 21).

Enfin, l'agent réducteur DL-dithiothréitol (DTT) s'est révélé le plus efficace (Entrée 22). Aucun sous-produit n'a été identifié et les rendements étaient très élevés avec des temps de réaction extrêmement réduits (1 h au lieu de 48 h). Une optimisation de la réaction visant la diminution des quantités de réactifs a été menée. Les résultats de celle-ci montrent une diminution drastique des quantités de produit utilisées avec un passage de 50 équivalents de DTT et disulfure à respectivement 1.4 et 1.3 équivalents, pour une augmentation de 1 à 120 h du temps de réaction (Entrée 23). Enfin, une expérience en absence de K_2CO_3 (Entrée 24) a montré la nécessité de la présence d'une base pour effectuer la réaction.

II.5.4.4.2 Spectre de la réaction

Ayant trouvé un agent soufré facilement déprotégeable et capable d'effectuer facilement des réactions de $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$, nous avons souhaité étendre cette réaction à d'autres substrats. Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier des molécules benzéniques portant un groupement électroattracteur en *ortho* ou *para* d'un halogène (Figure 7).

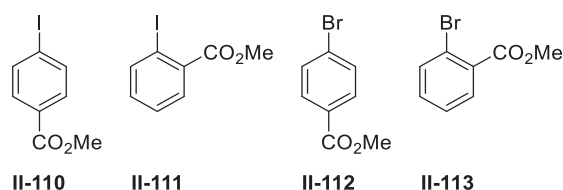


Figure 7 : Molécules tests pour introduire un groupement mercaptopropionitrile.

Malheureusement, aucun des tests effectués n'a donné le produit escompté et le produit de départ a été récupéré. Notre molécule portant un nombre important de groupement électroattracteurs, nous avons supposé que ceux-ci étaient requis pour permettre la réaction. Voulant vérifier la robustesse de celle-ci sur notre substrat spécifique, nous avons testé une tétra $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ sur le composé tétrabromé **II-114** (Schéma 43). Malgré une cinétique plus lente nécessitant un excès de disulfure et de NaBH_4 , nous avons réussi à isoler le produit tétrathiolé **II-115** avec un rendement de 61%.

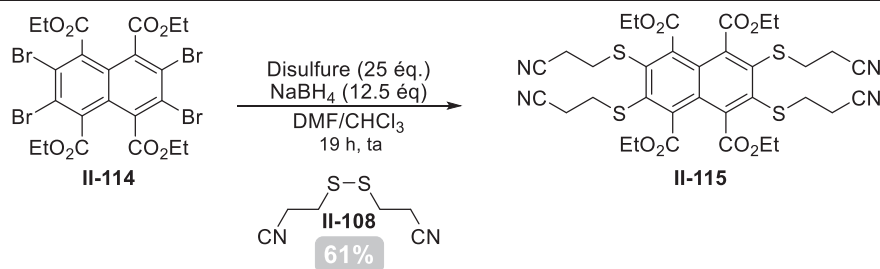


Schéma 43 : Synthèse du composé **II-115** issu d'une tétra S_NAr .

II.5.4.5. La saponification des esters

Suite à l'obtention du composé dithiolé **II-109**, l'étape suivante consistait en la saponification des esters et la déprotection des thiols pour obtenir le composé dithiol tétra acide **II-116** (Schéma 44). En premier lieu, les conditions KOH 1.3M dans un mélange $H_2O/EtOH$ (1:1, v/v) et en milieu anaérobie ont été employées (Tableau 6, Entrée 25). La brique se solubilise lentement à reflux et après 3 h de réaction le milieu est acidifié avec HCl et un précipité se forme. Malencontreusement, la molécule obtenue **II-117** ne correspondait pas au produit désiré **II-116** mais à celui issu de la simple déprotection des thiols.

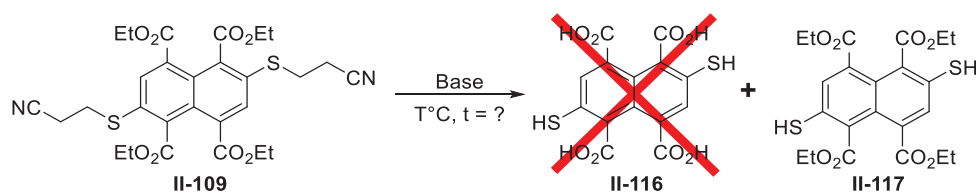


Schéma 44 : Saponification des esters et déprotection concomitante des thiols

Les esters semblant très résistants à la saponification, diverses méthodes ont été employées pour tenter de générer les acides carboxyliques correspondant. Lorsque la réaction est effectuée à ta dans la solution KOH 1.3M dans un mélange $H_2O/EtOH$ (1:1, v/v) (Entrée 26), le produit **II-107** est obtenu avec un rendement de 85%. Un changement de l'éthanol pour l'isopropanol (Entrée 27) ne permit pas d'accéder à la structure désirée et mena à un mélange complexe. Le même résultat fut observé lorsque KOH 1.3M fut préparé dans l'isopropanol pur (Entrée 28). Diverses sources d'ions hydroxydes ont été testées tel la litine (Entrée 29) mais seule une quantité très importante de CsOH a permis d'obtenir un début de saponification (Entrée 30-31).

Tableau 6 : Conditions pour saponifier les esters.^a

Entrée	Base	Quantité	Solvant	T°C	Rendement
25	KOH	1.3 M	EtOH/ H_2O	Reflux	II-117 (35%)
26	KOH	1.3 M	EtOH/ H_2O	rt	II-117 (85%)
27	KOH	1.3 M	<i>i</i> PrOH/ H_2O	Reflux	Mélange complexe
28	KOH	1.3 M	<i>i</i> PrOH	Reflux	Mélange complexe
29	LiOH	100 équ.	<i>i</i> PrOH	Reflux	Mélange complexe
30	CsOH	100 équ.	EtOH/ H_2O	Reflux	Début de saponification
31	CsOH	100 équ.	H_2O	Reflux	Saponification

^a Tétraester **II-109** (1 équ.), dans solvant (5 mL pour 50 mg de **II-109**)

A partir de ce résultat, un suivi RMN de la réaction dans le D₂O a été effectué (Figure 8). Il ressort que 2 jours sont nécessaires pour atteindre pour saponifier intégralement les esters. De plus, l'apparition de nouveaux pics dans la zone des aromatiques laisse supposer une oligomérisation partielle des espèces dithiolées générées.

Cette expérience a été répétée dans l'eau (Entrée 31) mais il s'avère que l'acidification finale ne permet pas de faire précipiter les produits issus de cette oligomérisation. La présence d'un nombre d'acides important les rendant trop fortement hydrosolubles. La présence d'une quantité très importante de sels (plusieurs grammes pour 200 mg de produit) rendant impossible l'isolement du produit par lyophilisation, une purification sur colonne C18 a été testée. Malencontreusement, le produit n'est pas retenu et est élué dans le pic d'injection avec les sels. Devant la grande difficulté à isoler le mélange d'oligomères, une stratégie envisagée était de réduire *in situ* les ponts disulfures dans l'espoir que la brique monomérique seule soit moins hydrosoluble et puisse précipiter en milieu acide.

Après 2 jours à reflux dans une solution de CsOH dans le D₂O et l'observation par RMN de la disparition complète des esters (Figure 8), le pH a été ajusté à 7 par des ajouts successifs de HCl. Du DTT a alors été ajouté et la réaction a été suivie par RMN. Plusieurs pics dans la zone aromatique nous montrant la non-obtention d'un produit unique, il fut nécessaire de conclure qu'il n'était pas possible d'obtenir le produit désiré dans ces conditions.

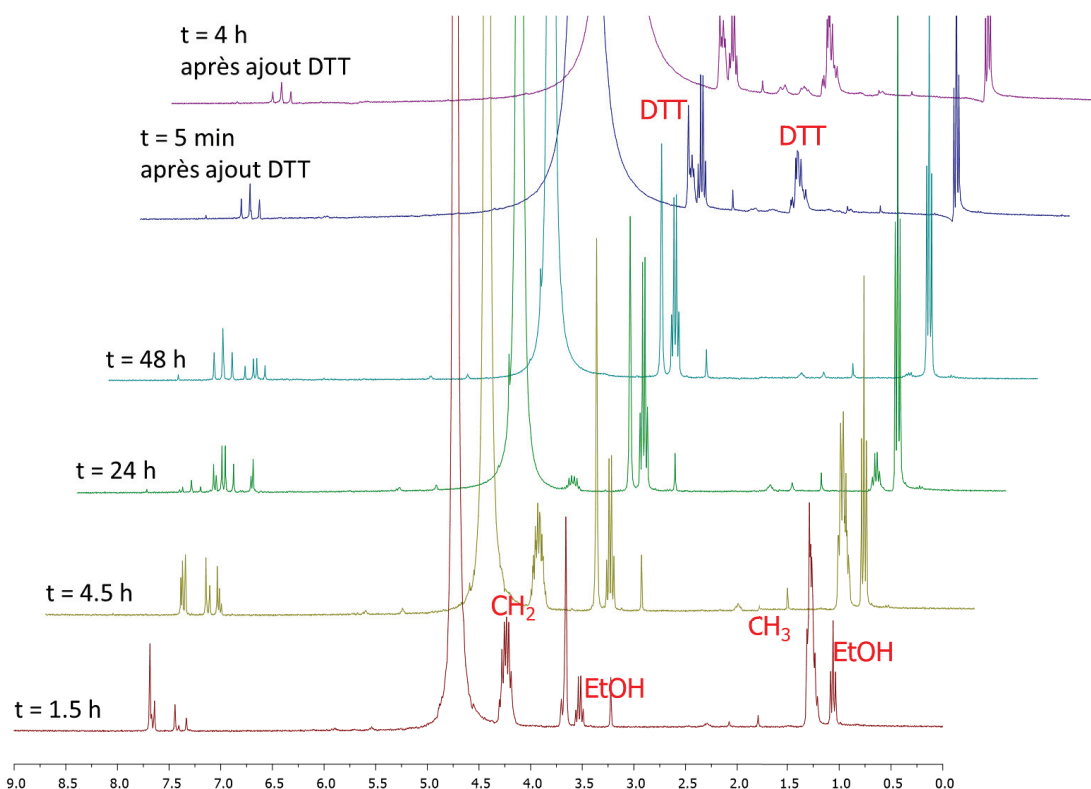


Figure 8 : Suivi cinétique de la saponification des esters par RMN ¹H (300 MHz, D₂O)

A l'heure actuelle, l'introduction de la fonction thiol est possible sur la brique naphthalène via le développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse permettant l'accès au composé **II-109**. La déprotection des esters est aussi maîtrisée mais l'isolement et la caractérisation des

produits issus de celle-ci reste problématique. Des travaux sont actuellement en cours pour introduire les groupement trityl et éthyle triméthylsilane.

II.6. SYNTHÈSE DE LA BRIQUE PYROMELLITIQUE D

La brique pyroméllitique **D** est un composé polyvalent ayant plusieurs objectifs dans le cadre de cette thèse (Figure 9). En premier lieu, l'introduction de groupement thiol en *para* du noyau aromatique permet d'utiliser les molécules ainsi créées comme briques moléculaires pour la CCD. Dans le même temps, la présence d'un halogène à la place des thiols permettrait de former de chaînes polymériques via une réaction de Sonogashira avec un dialcynes.

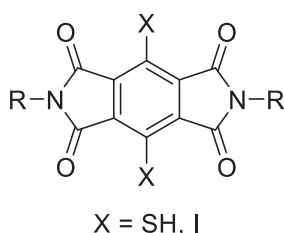


Figure 9 : Structure du noyau aromatique de la brique pyroméllitique **D**

II.6.1. Synthèse de la brique diiodée

Le début de la synthèse de la brique pyroméllitique a été décrite par Stoddart *et coll.*¹⁶² En partant de la brique 1,4-diiodo-2,3,5,6-tétraméthylbenzène **II-118**, une oxydation en présence de KMnO_4 à chaud permet d'obtenir le dérivé tétraacide **II-119** correspondant (Schéma 45). Le milieu réactionnel fut extrait à chaud avec une solution de KOH . Une acidification du filtrat suivi de l'évaporation de la phase aqueuse obtenue, puis d'une suspension du résidu dans l'acétone se révélèrent nécessaire pour obtenir le composé désiré. Ce dernier est ensuite chauffé à reflux dans un mélange $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$ pour obtenir le dianhydride **II-120**. Après ces deux premières étapes, notre synthèse diverge de celle de Stoddart *et coll.*

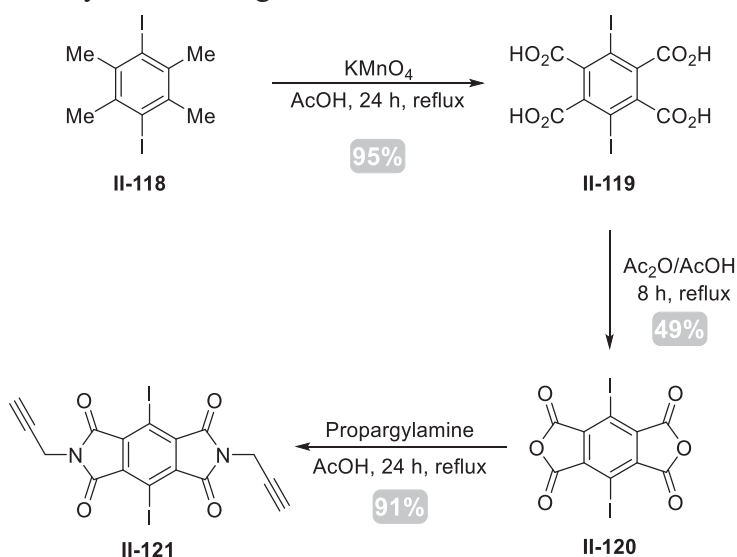


Schéma 45 : Voie de synthèse de la brique pyroméllitique **II-121** adaptée de Stoddart *et coll.*¹⁶²

II.6.1.2. Modification du bras espaceur

Pour former le diimide, il est nécessaire d'utiliser une amine primaire en large excès. Pour éviter d'utiliser de trop grandes quantités de nos dérivés saccharidiques, il a été décidé de former le diimide en chauffant un large excès de propargylamine au reflux de l'acide acétique. Le produit désiré **II-121** est récupéré par précipitation avec un rendement de 90%. Les différents saccharides **II-122** sont alors introduits grâce à un couplage azoture alcyne cuprocatalysé (CuAAC) avec des rendements de bons à excellents (Schéma 46).

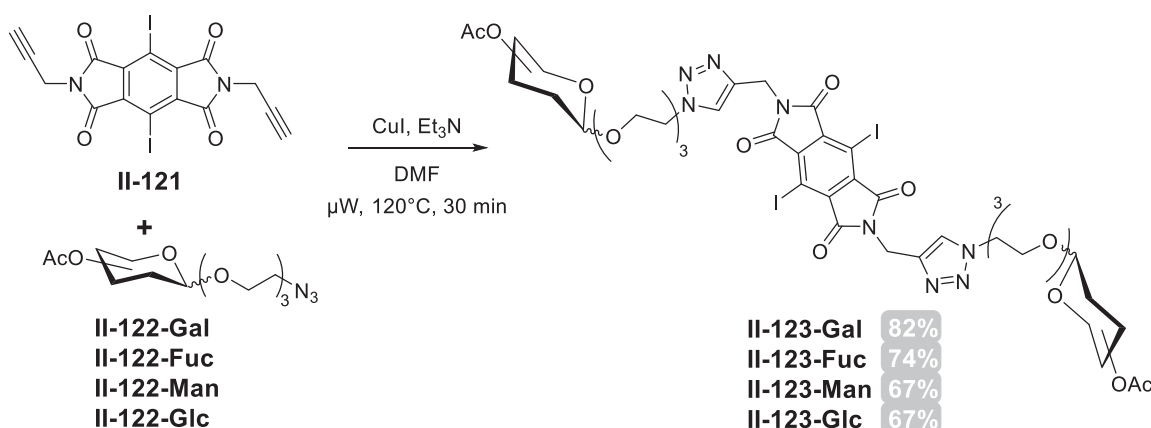


Schéma 46 : Formation des triazoles par réaction de CuAAC

II.6.1.3. Stabilité du diimide

Le bras espaceur est ainsi légèrement modifié par rapport aux briques **A** et **B** avec la présence d'un triazole. A ce stade, la molécule pourrait être utilisée pour des couplages de type Sonogashira. Toutefois, il apparaissait important de valider la stratégie de déprotection des acétyles. La déprotection a donc été testée via deux méthodes : l'utilisation de méthoxyde de sodium en quantité catalytique et un mélange MeOH/H₂O/Et₃N. Dans les deux cas, l'ouverture des diimides est observée en spectrométrie de masse pour restaurer deux amides et deux acides (Schéma 47). Les deux régioisomères possibles de **II-124** sont observés en RMN.

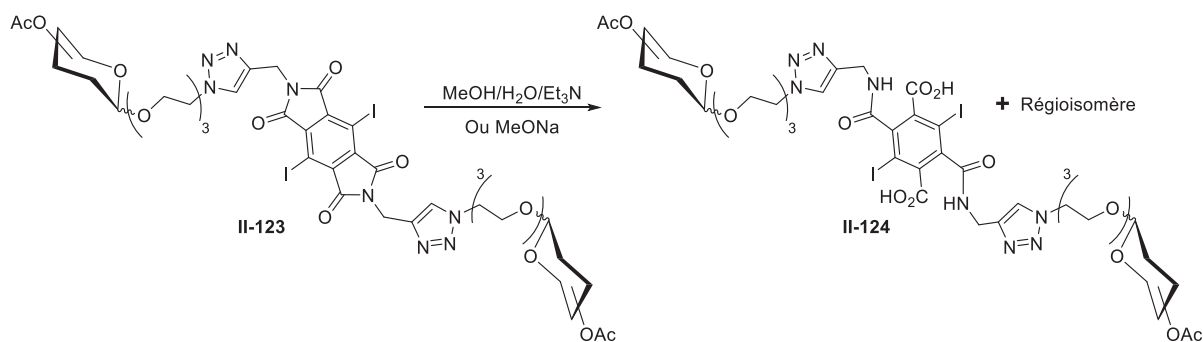


Schéma 47 : Déprotection des acétyles avec ouverture des diimides

Bien que la molécule désirée ne soit pas obtenue, ce résultat reste intéressant car les acétyles sont bien déprotégés et le diacide résultant de l'ouverture du diimide peut être utilisé pour

introduire un autre dérivé saccharidique via la formation d'un nouveau lien amide. Les tentatives de déprotection n'ont pas été investiguées plus avant et l'introduction de la fonction thiolée à la place des halogènes a été étudiée.

II.6.2. Introduction de la fonction thiolée

II.6.2.1. Catalyse au cuivre

L'introduction de la fonction thiolée ne peut avoir lieu qu'après l'étape d'oxydation des méthyles par KMnO_4 pour éviter toute oxydation du soufre en sulfoxyde ou sulfone. La méthode développée par le groupe de Dawei Ma¹⁴⁰ a été employée au stade du tétraacide **II-119**, du dianhydride **II-120** et du diimide **II-121** (Schéma 48).

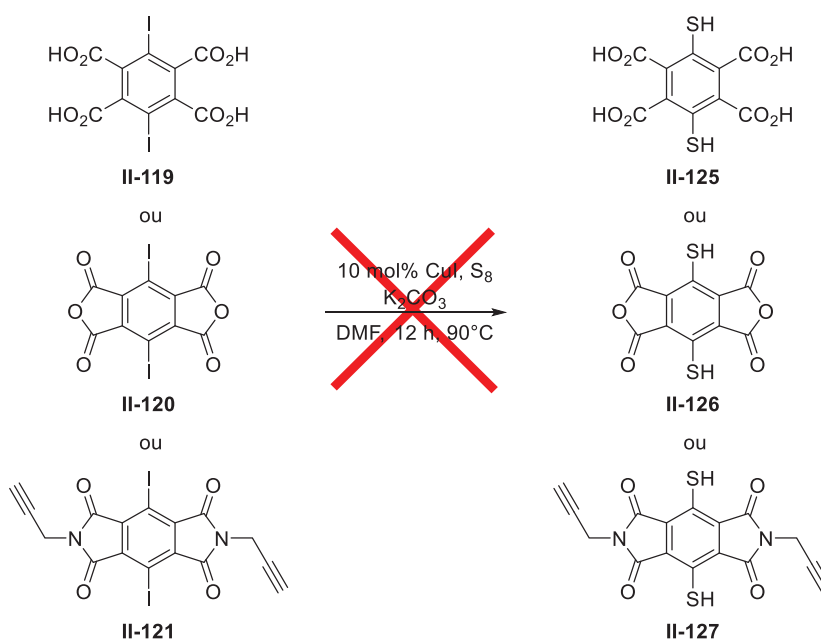


Schéma 48 : Application de la méthode de Dawei Ma à la synthèse des dérivés pyroméllitiques iodés

Aucune des diverses expérimentations n'a permis d'obtenir l'introduction de la fonction thiol sur nos molécules. Pour vérifier que le problème ne venait pas des réactifs, l'expérience a été répétée sur des substrats issus de la publication. Bien que les rendements soient éloignés de ceux annoncés (40-50% au lieu de >90%), l'observation de la présence de l'espèce de départ explique les faibles rendements obtenus et ne remet pas en cause la validité de la méthode.

II.6.2.2. Substitution nucléophile aromatique

La deuxième stratégie employée fut celle développée par Stefan Matile sur les naphthalènes.¹⁵⁷ Le groupement méthanthiol fut testé sur les composés tétraacide **II-119**, dianhydride **II-120** et diimide **II-121** précédemment abordés et ne donna aucun résultat probant (Schéma 49). Néanmoins, les résultats obtenus par Matile et nous-même impliquaient des groupements fonctionnels esters.

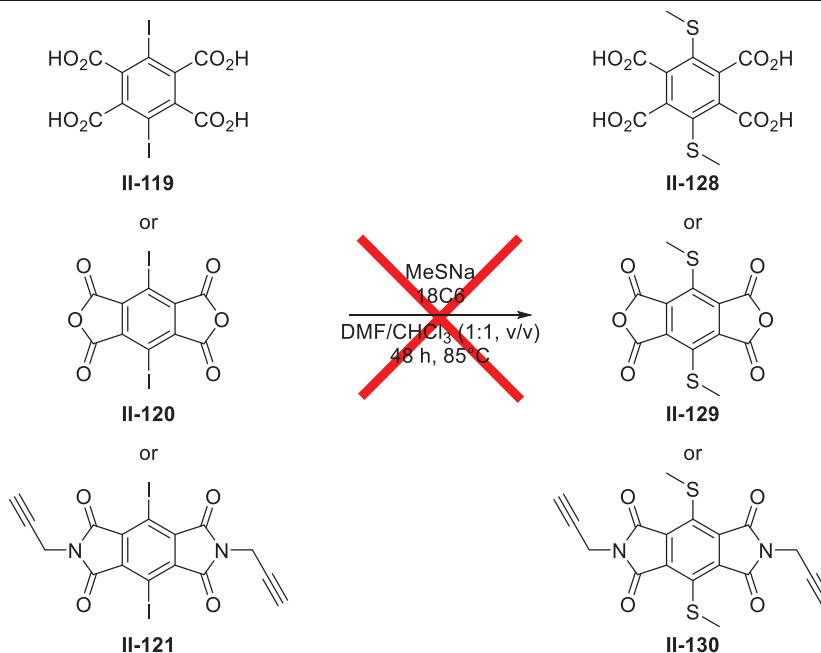


Schéma 49 : Application de la méthode décrite par Stefan Matile sur des dérivés pyroméllitiques iodés

II.6.2.2.1. Synthèse du composé tétraester diiodé

La synthèse de la molécule tétraester diiodée fut entreprise. Il s'avéra assez difficile d'obtenir celle-ci et une optimisation des conditions employées dû être effectuée (Tableau 7).

Tableau 7 : Conditions testées pour obtenir la brique tétraester diiodée **II-131**

Entrée	Conditions	Produit obtenu	Rendement
32	SOCl ₂ / MeI	Diester	37%
33	Orthoformiate de méthyle	Diester	65%
34	DMSO / KOH / MeI	Tétraester	91%

^a **II-119** (1 éq) dans solvant (5 mL pour 100 mg)

Les conditions employant le chlorure de thionyle en présence d'iodure de méthyle (Entrée 32) ainsi que l'utilisation d'orthoformiate de méthyle (Entrée 33) se révélèrent inefficaces, la réaction s'arrêtant à l'intermédiaire diester. Finalement, KOH dans le DMSO en présence d'iodure de méthyle permit l'obtention du tétraester **II-131** désiré (Entrée 34).

II.6.2.2.2. Substitution nucléophile aromatique sur le composé tétraester

En appliquant les conditions classiques de Matile, 10% de rendement du produit dithiolé **II-132** désiré fut obtenu (Schéma 50). Parmi les autres espèces formées, un intermédiaire mono SMe et des produits issus de la déhalogénéation du tétraester de départ furent observés.

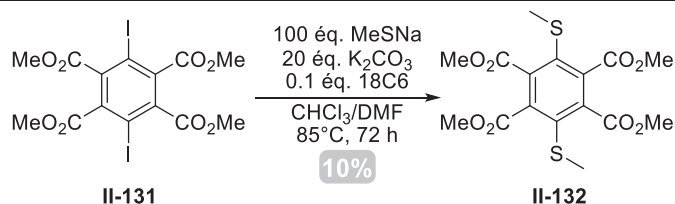


Schéma 50 : S_NAr du méthanethiol sur la brique pyroméllitique diiodée

II.6.3. Synthèse du dérivé tétraester dibromé

Devant la faiblesse de ce rendement, nous avons envisagé de changer l'halogène en espérant une meilleure réactivité de celui-ci. Stoddart *et coll* ayant décrit la synthèse pour les groupements fluorés, chlorés, bromés et iodés,¹⁶² celle-ci fut répétée pour obtenir le dérivé tétraester dibromé **II-135** (Schéma 51).

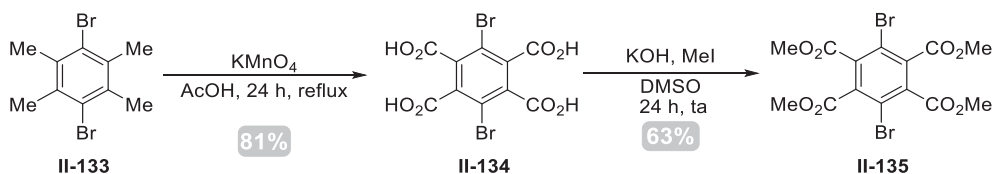


Schéma 51 : Synthèse du dérivé tétraester dibromé **II-135**

Après synthèse de ce dernier, les conditions de Matile en présence de méthanethiolate de sodium permirent l'obtention du produit tétraester di-SMe **II-132** avec un rendement de 67% (Schéma 52).

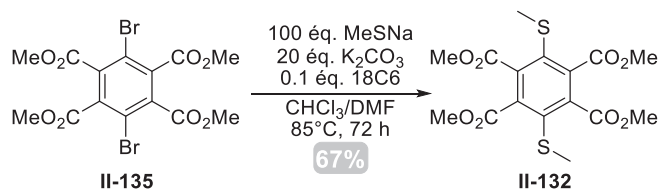


Schéma 52 : S_NAr du méthanethiol sur la brique pyroméllitique dibromée

Devant le succès de la méthode de Matile avec le composé dibromé, nous avons essayé la méthode développée sur les naphthalènes pour introduire directement le groupement mercaptopropionitrile. La disparition du produit de départ a été observée mais la déhalogénéation des composés dibromés et diiodés reste prédominante et le produit, observé par spectrométrie de masse n'a pu être isolé jusqu'à présent. Néanmoins, d'autres groupements thiolés déprotégeables sont actuellement en cours d'investigation pour obtenir la molécule dithiolée tétraester.

La synthèse des composés issus de la brique **D** reste problématique. D'une part, la dernière étape de déprotection n'est pas encore maîtrisée et le diimide semble s'ouvrir très facilement. D'autre part, l'introduction d'un thiol déprotégeable reste problématique et la déhalogénéation des dérivés bromés et iodés est observée.

II.7. SYNTHESE DES DERIVES SACCHARIDIQUES

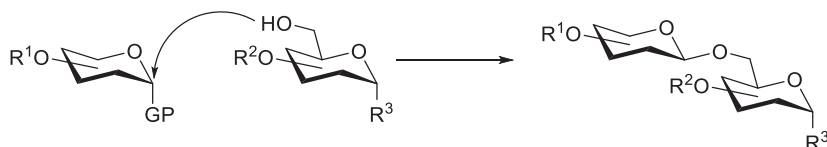
Pour obtenir des molécules ayant la faculté de reconnaître les sites de liaison des lectines, il était indispensable de synthétiser les différents saccharides sélectionnés ainsi que leurs bras espaceur. Cette partie s'intéresse aux différentes synthèses des dérivés saccharidiques ainsi qu'aux stratégies mises en œuvre pour éviter l'apparition de sous-produits lors de la formation du lien amide.

II.7.1. Rappels sur la glycosylation

Parmi les multiples réactions envisageables sur un saccharide, la glycosylation reste la plus étudiée. Elle est régie par de nombreux paramètres : groupement participant, effet anomère, addition axiale aux oxoniums et son contrôle permet l'orientation de la liaison glycosidique (α ou β) reliant la position C₁ du saccharide à son aglycone. Cette orientation dans l'espace peut paraître anodine mais les différences d'affinités entre des dérivés α - ou β -saccharidiques peuvent varier de plusieurs ordres de grandeurs. Ainsi, le contrôle de cette liaison a toujours été un défi pour les chimistes.

Deux mécanismes sont concevables pour la formation de la liaison glycosidique. Le premier est une réaction classique de S_N2 inversant la configuration du carbone anomère via le déplacement d'un groupement partant (Schéma 53a).¹⁶³

a) Mécanisme S_N2



b) Mécanisme S_N1

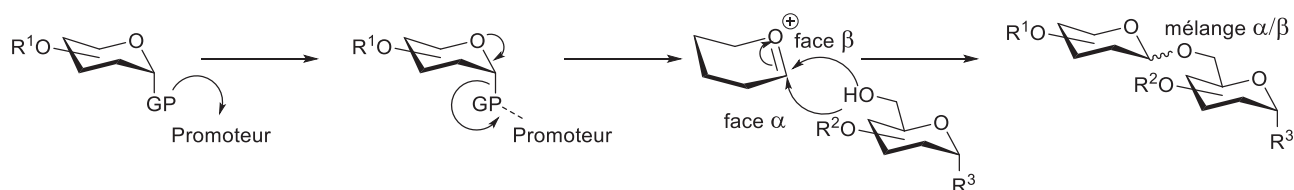


Schéma 53 : Mécanisme de glycosylation. a) Par S_N2. b) Par S_N1.

Cette méthode est la seule permettant un total contrôle du centre anomère via une réaction stéréospécifique. Le deuxième mécanisme est de type S_N1 passant par la formation d'un oxonium suite au départ d'un groupement partant en position C₁. L'attaque d'un groupement nucléophile sur la face α ou β amène à la formation du lien glycosidique (Schéma 53b).¹⁶³ Généralement, un promoteur est nécessaire pour activer le groupement partant et effectuer la réaction. Dans ce deuxième mécanisme, jouer sur les conditions réactionnelles permet d'augmenter la sélectivité de l'attaque et de favoriser la formation préférentielle d'un anomère vis-à-vis de l'autre.

Via les différentes synthèses de dérivés saccharidiques sélectionnées, nous allons voir plusieurs des mécanismes permettant de contrôler la sélectivité de la réaction.

II.7.2. Synthèse des dérivés β -D-galactose et β -D-glucose

Les synthèses des deux dérivés glucose et galactose étant similaires, elles seront étudiées ensemble. L'objectif est d'introduire un bras espaceur de type triéthylèneglycol (TEG), motif qui sera commun à tous les dérivés saccharidiques synthétisés, porteur en bout de chaîne d'un groupement azoture permettant soit le couplage via une réaction CuAAC soit la réduction de ce dernier en amine primaire pour la formation de lien amide.

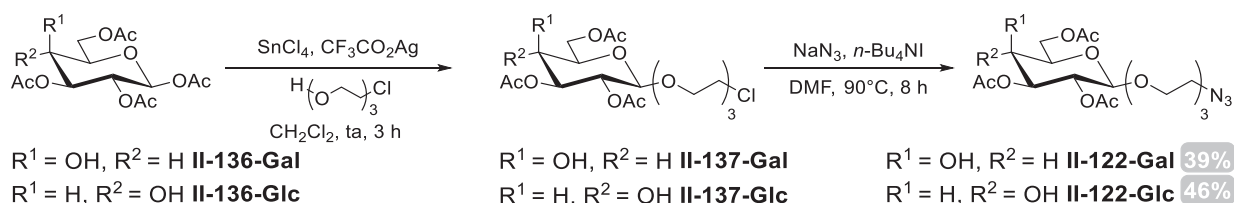


Schéma 54 : Voie de synthèse des β -D-galactoside **II-122-Gal** et β -D-glucoside **II-122-Glc**

La méthodologie pour atteindre les dérivés saccharidiques avait déjà été optimisée au laboratoire^{164,165} en se basant sur de précédents travaux de Lipták.¹⁶⁶ En partant soit du β -D-glucose (**II-136-Glc**), soit du β -D-galactose (**II-136-Gal**) en version peracétylée, la première étape consiste en une glycosylation avec une assistance anchimérique en C₂ suite à la formation de l'oxonium issu du départ de l'acétate en position anomère (Schéma 54). Cette participation du groupement acétyle formant un acyloxonium bloque la face α du saccharide et force l'attaque en β de l'alcool (Schéma 55). Seul l'anomère β est obtenu après purification.

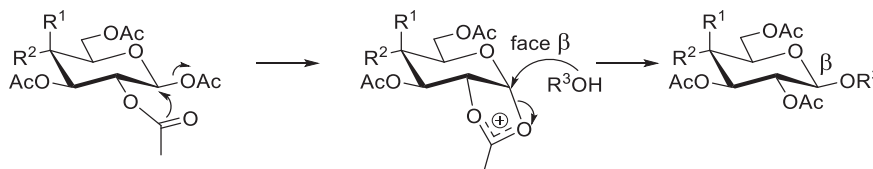


Schéma 55 : Mécanisme de la glycosylation avec une participation en C₂

La deuxième étape implique l'introduction de l'azoture par réaction de S_N2 sur le chlore terminal de la chaîne TEG. Le chauffage de NaN₃ dans le DMF en présence de *n*-Bu₄NI est une réaction totale dont le seul mais néanmoins important danger réside dans la manipulation de l'azoture de sodium. Les deux saccharides sont purifiés via chromatographie et les dérivés galactosylé **II-122-Gal** et glucosylé **II-122-Glc** sont obtenus après deux étapes avec des rendements de 39% et 43% respectivement.

II.7.3. Synthèse du dérivé α -D-mannose

La synthèse du composé mannosylé est très similaire (Schéma 56). Les seuls changements résidant dans l'orientation de la liaison anomère et dans le promoteur.¹⁶⁷ En effet, le groupement acétyle en C₂ étant axial, l'acyloxonium créé bloquera l'attaque en β et forcera celle en α (Schéma 57). Ainsi, seul le composé α -D-mannose **II-137-Man** sera obtenu après purification.

Après réaction avec NaN_3 , le dérivé mannosylé **II-122-Man** est synthétisé avec un rendement de 40% sur deux étapes.

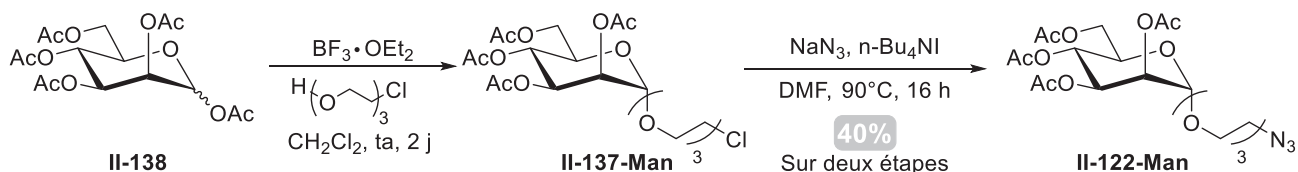


Schéma 56 : Voie de synthèse du dérivé α -D-mannose **II-122-Man**

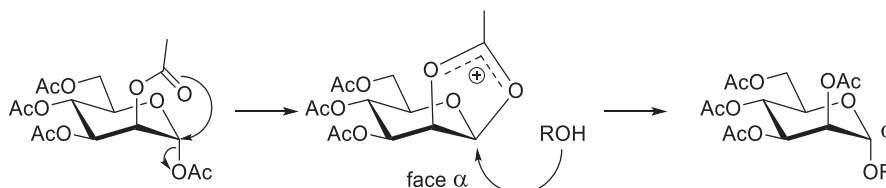


Schéma 57 : Mécanisme de la glycosylation du mannose avec une participation axiale en C_2

II.7.4 Synthèse du dérivé α -L-fucose

La dernière synthèse concerne le dérivé fucosylé (Schéma 58). L'objectif est d'obtenir le α -L-fucose portant une chaîne TEG. Cette fois-ci, aucune assistance en C_2 n'est envisageable puisqu'elle favoriserait le composé β . Au laboratoire, une stratégie fondée sur la réaction d'Appel¹⁶⁸ sur le L-fucose s'est montrée la plus efficace en favorisant un ratio 65/35 pour l'anomère α .¹⁶⁹ La séparation étant impossible à ce stade, une acétylation des groupements hydroxyles en présence de pyridine et d'anhydride acétique puis la $\text{S}_{\text{N}}2$ du chlore via NaN_3 furent effectuées. Un mélange de solvant ternaire $\text{CHCl}_3/\text{EP}/\text{Acétone}$ permet la séparation des deux anomères pour obtenir **II-122-Fuc**. Toutefois, il a été observé la présence mineure d'autres produits isobares attribués à des formes furanoses.

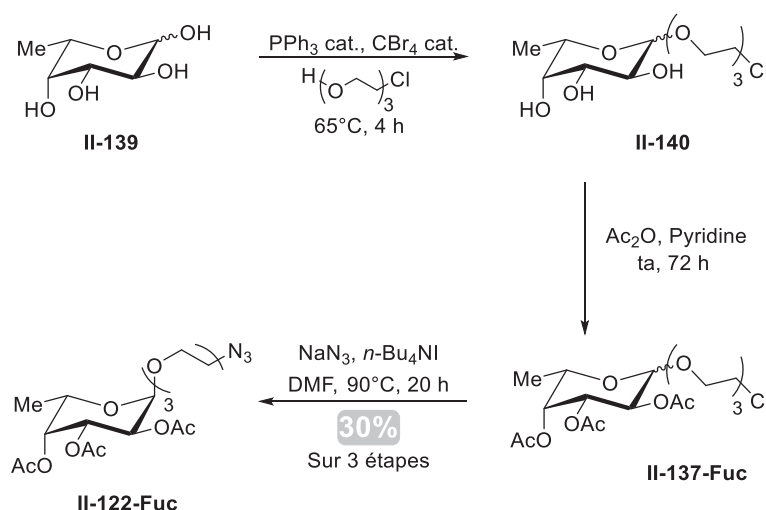


Schéma 58 : Voie de synthèse du dérivé α -L-fucose **II-122-Fuc**

II.7.5. Formation parasite d'un composé *N*-acétyl

Une fois ces 4 composés saccharidiques obtenus, ils pouvaient être utilisés pour des réactions de couplage CuAAC pour former un triazole en présence d'une triple liaison. Cette stratégie a été employée avec la brique moléculaire diiodée **D** et le sera avec la **C**. En revanche, il était nécessaire de réduire l'azoture en amine pour former le lien amide nécessaire aux synthèses dérivant des briques acides **A** et **B**. Cette réduction a été effectuée dans des conditions classiques en présence de palladium sur charbon sous pression de dihydrogène et permet d'obtenir, après filtration sur célite, le produit désiré **II-63**. Néanmoins, un signal large en RMN aux alentours de 6.25 ppm est aussi observé. Celui-ci a été attribué à la formation d'un acétamide suite à la migration d'un des acétyles du saccharide sur l'amine générée. Selon les lots, ce sous-produit représentait entre 2 et 10% du milieu réactionnel. Ce *N*-acétyl **II-77** ayant la même polarité que les molécules issues de la formation du lien amide, il apparaissait nécessaire de limiter au maximum sa présence. Pour cela, une stratégie permettant une séparation entre l'amine et le *N*-acétyl était nécessaire avant le couplage avec les briques acides **A** et **B**.

II.7.6. Synthèse alternative des dérivés saccharadiques aminés

Nous avons développé une synthèse alternative où l'azoture était réduit, toujours par du Pd/C sous atmosphère de dihydrogène, en présence de Boc₂O. Ainsi, l'amine libérée réagissait très rapidement avec Boc₂O pour former le carbamate **II-141**. Ce dernier peut être isolé très facilement par chromatographie et aucune trace de *N*-acétyl n'a été observée (Schéma 59).

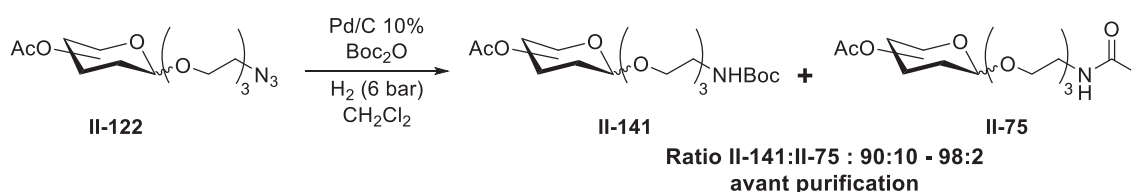


Schéma 59 : Synthèse des composés **II-141** protégés par un Boc.

Une deuxième étape impliquant la déprotection du Boc par l'acide trifluoroacétique et la formation d'un sel ammonium/trifluoroacétate a permis l'obtention d'une amine protonée ne pouvant réagir avec les acétyles (Schéma 60). Cet intermédiaire **II-78** stable a été utilisé à la place de l'amine NH₂ classique pour les réactions permettant la formation du lien amide.

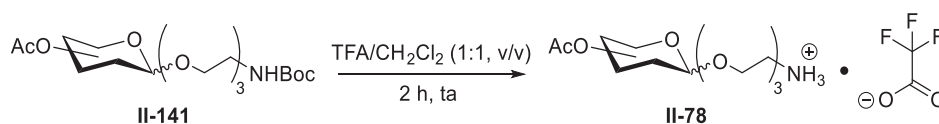


Schéma 60 : Synthèse des composés **II-78** utilisés pour les réactions de couplage peptidique.

II.8. CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons abordé la synthèse des différentes briques moléculaires dithiophénol sélectionnées pour être utilisées en CCD (Figure 10). Nous avons vu que la synthèse des composés possédant les noyaux aromatiques **A** et **B** a pu être menée à son terme avec quatre saccharides : glucose, mannose, galactose et fucose. Le réarrangement de Newman-Kwart a été l'étape clé qui nous a permis d'introduire le motif dithiol sur la molécule. Bien qu'originellement envisagé comme groupement protecteur, le motif *S*-thiocarbamate s'est révélé problématique lors de l'étape de déprotection avec la formation intramoléculaire d'un cycle à 6 avec l'amide en *ortho*. Le groupement 2-cyanoéthyle s'est révélé un bon groupement protecteur du thiol et après réajustement de la synthèse, a permis d'obtenir les molécules désirées.

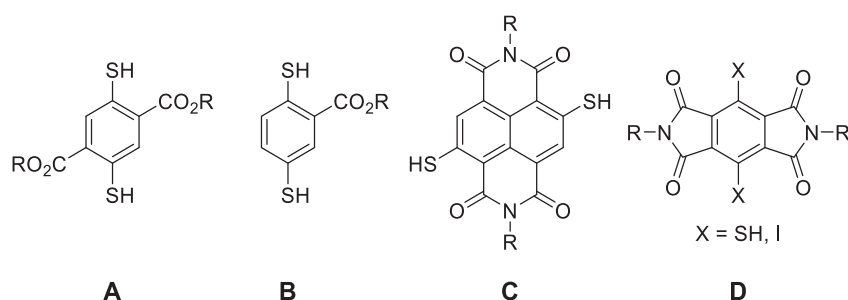


Figure 10 : Noyaux aromatiques cibles

Les composés issus des noyaux aromatiques **C** et **D** se sont révélés plus problématiques notamment à cause de plus grandes difficultés pour installer le motif dithiol. Après de nombreux essais, une nouvelle méthode employant la génération *in situ* du mercaptopropionitrile à partir de la réduction via le DTT du disulfure correspondant s'est avérée efficace pour réaliser une réaction de S_NAr sur des composés naphtyles tétraesters di- ou tétrabromés. Malencontreusement, l'étape suivante impliquant la saponification des esters et la déprotection des thiols s'est révélée problématique avec la grande résistance des esters aux conditions d'hydrolyse et une solubilité trop grande dans l'eau des oligomères formés.

Plusieurs problèmes ont aussi émergé lors de la synthèse de la brique pyroméllitique **D**. En premier lieu, l'étape finale de déprotection des acétyles du saccharide entraîne l'ouverture du diimide. De plus, l'introduction du motif thiolé n'a toujours pas été réussie à ce jour avec un groupement thiol facilement déprotégeable. Des résultats préliminaires ont révélé la possibilité d'introduire un groupement SMe et, bien que non isolé, il a été observé par spectrométrie de masse l'insertion du motif mercaptopropionitrile.

Après ces synthèses aux succès divers, nous possédons 10 briques moléculaires 1,4-dithiophénol prêtes à être étudiées en CCD (Figure 11). Quatre sont monovalentes et six divalentes. Fondée sur les résultats du groupe de Sanders et de notre groupe (CSAp), la formation de macrocycles est attendue. L'étude du comportement en CCD de ces objets ainsi que leurs interactions avec les lectines seront le thème du prochain chapitre.

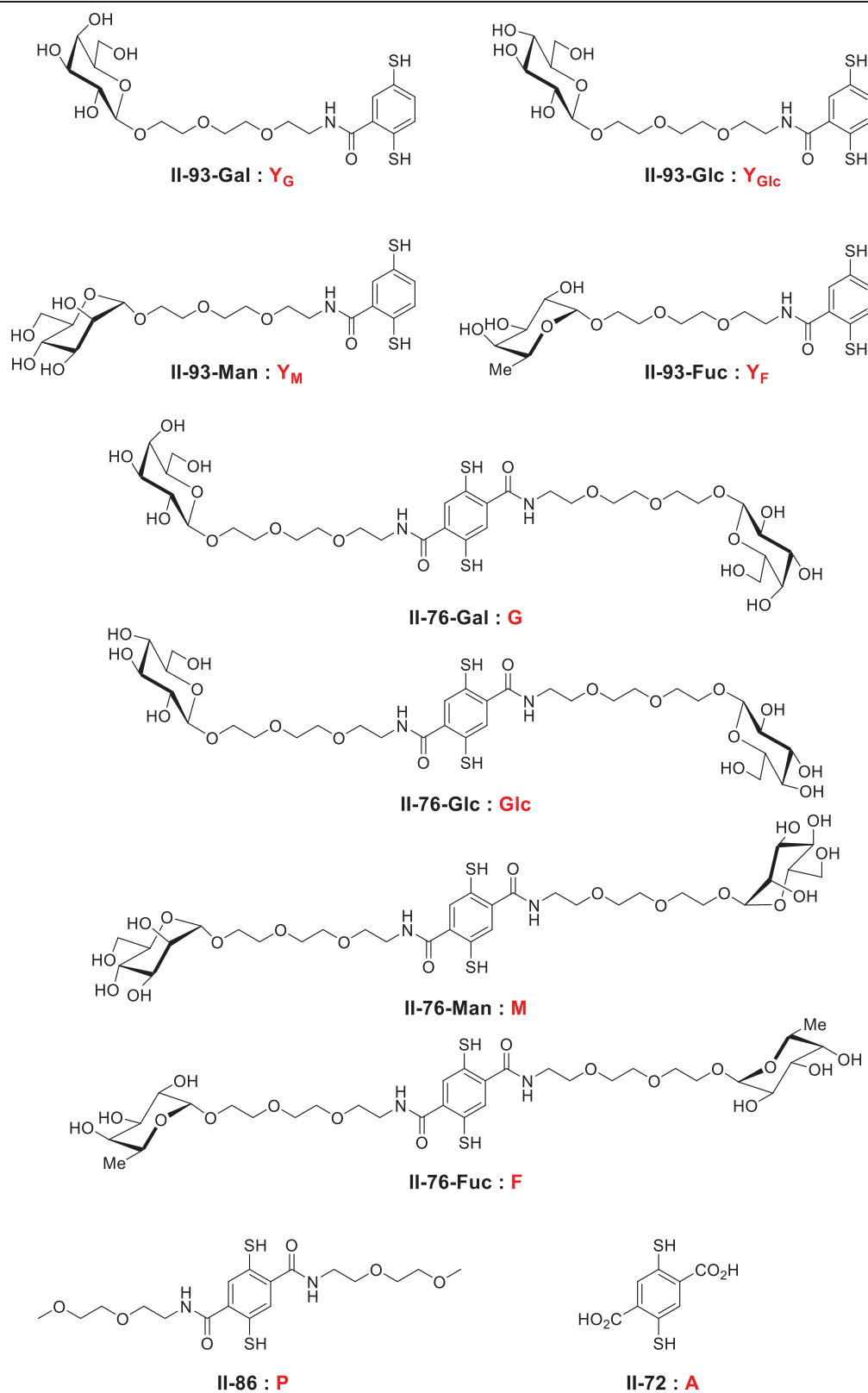


Figure 11 : Briques moléculaires synthétisées et utilisées en CCD. En rouge, code utilisé pour la CCD

Chapitre 3

Etude de briques dithiophénols glycosylées en chimie combinatoire dynamique

III.1. INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous décrivons l'étude et l'optimisation de chimiothèques combinatoires dynamiques générées à partir des différentes briques moléculaires dont la synthèse a été précédemment décrite. Leurs amplifications et affinités obtenues avec différentes lectines seront aussi abordées. La principale lectine-modèle qui a été étudiée est la concanavoline A (ConA), une lectine facilement accessible et déjà utilisée en CCD par les groupes de Lehn et de De Mendoza.¹⁷⁰⁻¹⁷³

Après des rappels bibliographiques sur la lectine ConA, la liaison disulfure et la présentation de l'état de l'art dans le domaine de la CCD impliquant liaison disulfure et lectine, nous aborderons les travaux expérimentaux menés pour optimiser les conditions d'oligomérisation de nos composés divalents **II-76**. Puis, nous discuterons les résultats obtenus en présence de ConA. Nous continuerons par l'étude des briques moléculaires monovalentes **II-93** et leur oligomérisation avec leurs analogues divalentes. Enfin, nous terminerons par les études ITC effectuées entre les glycodyn[n]arènes et les lectines cibles.

III.1. Rappels bibliographiques

III.1.1. Concanavoline A

Devant le coût élevé des lectines de *Pseudomonas aeruginosa* (3000 € les 5 mg), l'optimisation de notre protocole de génération de bibliothèque a été effectuée avec une lectine modèle, moins chère et déjà validée en termes de compatibilité avec la CCD des liaisons disulfures. La lectine retenue, la concanavoline A, possède de nombreux avantages. En premier lieu, c'est une des lectines les plus étudiée par la communauté scientifique¹⁷¹ et elle peut s'acheter à des prix très raisonnables (104 € les 100 mg : prix catalogue Sigma-Aldrich)¹⁷⁴ en version lyophilisée ou supportée sur billes de sépharose. De plus, comme LecA et LecB, cette lectine est en solution et à pH physiologique un homotétramère possédant quatre sites de liaisons. Enfin, ne contenant aucun résidu de type cystéine, ConA n'a aucune possibilité d'interagir avec les objets moléculaires formés dans nos chimiothèques combinatoires dynamiques. ConA a donc été choisie comme modèle pour développer nos conditions opératoires avant d'étendre nos travaux aux lectines de *Pseudomonas aeruginosa*.

III.1.2. Oligomérisation des 1,4-dithiophénols en dyn[n]arènes

La première référence relatant la macrocyclisation de 1,4-dithiophénol est celle de Wong et Marvel.¹⁷⁵ Partant du 1,4-dithiophénol **III-1** dans l'éthanol, l'oxydation des thiols par le diiode conduit à la formation préférentielle du cyclotrimère **III-2** (Schéma 1).

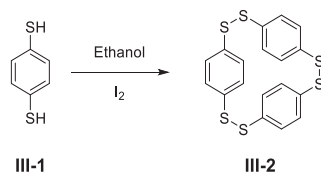


Schéma 1 : Synthèse du premier macrocycle polydisulfure à partir de 1,4-dithiophénol

En 1979, Raasch synthétisa le premier macrocycle polydisulfure fonctionnalisé issu d'un 1,4-dithiophénol.¹⁷⁶ L'oxydation du 2,3,5,6-tétrafluoro-1,2-dithiophénol **III-3** par le DMSO conduit à la formation exclusive du cyclotétramère **III-4** qui précipite spontanément (Schéma 2).

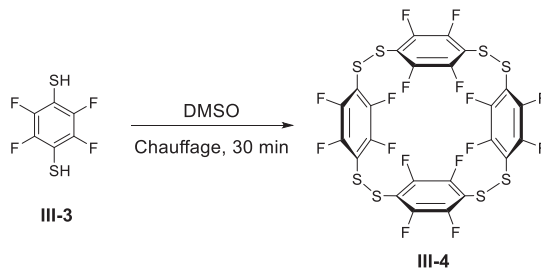


Schéma 2 : Synthèse du tétrafluoro-tétramère

Le premier article traitant des *p*-cyclophanes dithiolés en CCD revient à Vial *et al.*¹²⁰ Leur objectif était de trouver un récepteur hydrosoluble de la polyamine biogénique : spermine, impliquée dans la ligand de l'ADN, la prolifération des cellules, la croissance des tumeurs et l'apoptose.

Partant des briques moléculaires monothiophénol **III-5** et dithiophénol **A**, l'équilibration dans l'eau à pH 8.25 et avec l'oxygène de l'air comme oxydant mena à la formation de différentes espèces linéaires et macrocycliques de type *p*-cyclophanes polydisulfures ou dyn[n]arènes (Schéma 3).

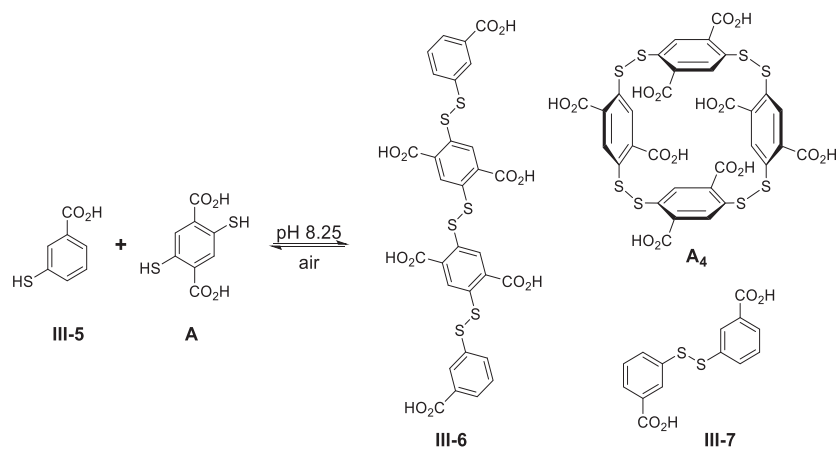


Schéma 3 : Chimiothèque à l'équilibre d'un mélange des briques **III-5** et **A**

L'ajout de spermine modifia fortement l'équilibre en amplifiant massivement le cyclotétramère [**A**₄] et par voie de conséquence le dimère linéaire **III-7**. Des expériences n'impliquant que la brique **A** furent mises en place pour vérifier que le macrocycle tétramérique était la molécule reconnue par la spermine. Si la chimiothèque sans spermine mena à une distribution des différentes espèces macrocycliques, la spermine amplifia quantitativement le macrocycle **A**₄, permettant son isolement par HPLC préparative. Une étude RMN couplée à de la modélisation moléculaire permit d'établir la structure de pseudo-rotaxane du complexe **A**₄-spermine. Des mesures ITC déterminèrent une constante de dissociation de 22 nM entre les deux partenaires. L'affinité correspondante étant supérieure à celle mesurée entre la spermine et l'ADN, des tests en présence d'ADN et de spermine furent effectués. En présence de spermine, la double hélice

d'ADN passe d'une hélice droite à une hélice gauche. L'ajout d'un équivalent du dyn[4]arène restaure la double hélice droite permettant de conclure que la capture de la spermine par le macrocycle inhibe son activité.

En 2013, Dehaen *et coll* reportèrent une nouvelle voie de synthèse pour former des macrocycles polydisulfures fonctionnalisés.¹⁷⁷ La mise en présence de briques 1,4-dialkoxybenzènes **III-8** (méthyle et éthyle) et de chlorure de soufre généra le bistétrasilfure cyclique **III-9**. Après isolement, la réduction des tétrasulfures par NaBH₄ puis l'oxydation à l'air des thiols engendra la formation des dyn[4]arènes **III-10** (Schéma 4). Néanmoins, les conditions utilisées ne sont pas compatibles avec un grand nombre de fonctions chimiques.

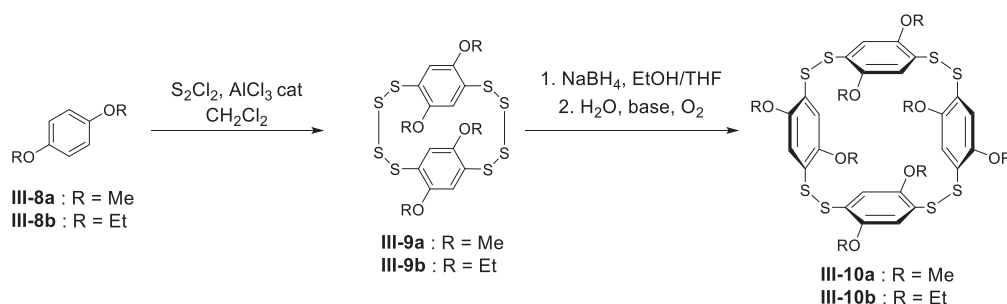


Schéma 4 : Synthèse du dyn[4]arène **III-10** à partir de briques moléculaires 1,4-dialkoxybenzène

Plus récemment dans notre laboratoire, l'auto-assemblage de briques 1,4-dithiophénols a mené à la formation de dyn[4]arènes. Ces objets ont été employés pour la reconnaissance moléculaire d'anions, de zwitterions et de cations (Figure 1).¹²¹

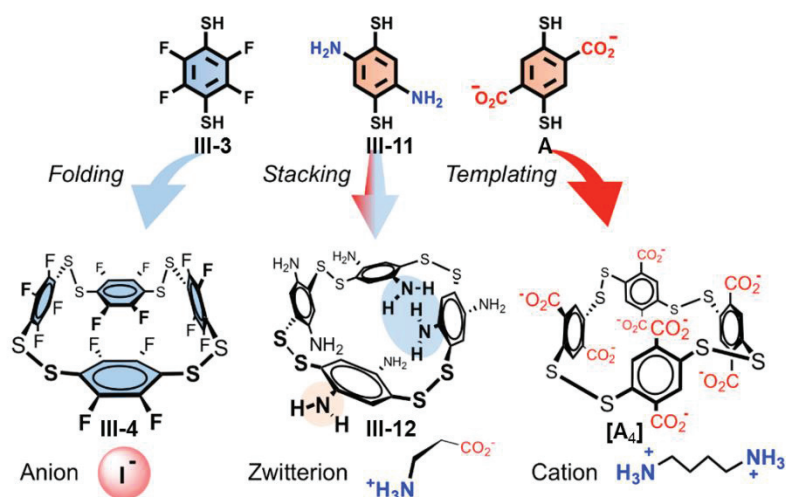


Figure 1 : 1,4-Dithiophénols polysubstitués et dyn[4]arènes formés en présence d'un template

En partant de la brique perfluorée **III-3**, seul le dyn[4]arène **III-4** est obtenu. Ce composé est capable de reconnaître l'anion I⁻ avec une affinité assez faible (K_d millimolaire) mais une sélectivité unique. La brique 2,5-diamino-1,4-dithiophénol **III-11** forme sélectivement le dyn[4]arène **III-12** qui précipite en solution.. Des titrations UV ont permis de déterminer des affinités micromolaires du cyclotétramère **III-12** pour des invités zwitterioniques comme les acides aminés β et γ . Enfin, la dernière famille de macrocycle étudiée prolonge les travaux

préliminaires sur la spermine.¹²⁰ En partant de la brique moléculaire **A**, les templates 1,4-butanediamine, spermine ou spermidine déplacent l'équilibre entre les macrocycles **A**₃, **A**₄, et **A**₅ pour amplifier quasi-quantitativement **A**₄. Des constantes de dissociation nanomolaires ont été mesurées par ITC et RMN pour la formation du pseudo-rotaxane. D'autres études ont depuis entreprise pour expliquer la sélectivité du dyn[4]arène pour les α - ω alkyldiammonium.¹⁷⁸ L'auto-assemblage des composés **III-3**, **III-11** et **A** en présence ou absence de templates a permis l'obtention de récepteurs moléculaires pour des espèces mono- ou polychargées avec des affinités variant entre le milli- et le nanomolaire. Grâce à cette méthode de préparation efficace, sélective et propre, les objets ont pu être synthétisés à l'échelle du gramme de façon éco-efficace. Grâce à cette méthodologie et à l'accès facile au dynarène **A**₄, ses propriétés de reconnaissance ont pu être investiguées.¹⁷⁹ Une analyse par dichroïsme circulaire en présence d'un dérivé de la (D)-lysine (**III-13**) a révélé la présence d'un effet Cotton positif à 318 nm et négatif à 348 nm. En inversant le centre chiral de ce dérivé (**III-14**), le spectre obtenu était inversé (Figure 2). Un étalonnage montra la corrélation entre le spectre de dichroïsme circulaire obtenu et l'excès énantiomérique entre les dérivés de L- et D-lysine. Une discrimination en dichroïsme circulaire de plusieurs autres dérivés de la lysine a pu aussi être obtenue en variant simplement le ratio entre **A**₄ et ces dérivés. Grâce à une simple analyse par dichroïsme circulaire, ce dyn[4]arène permet de mesurer des excès énantiomériques et de discriminer différents dérivés de la lysine.

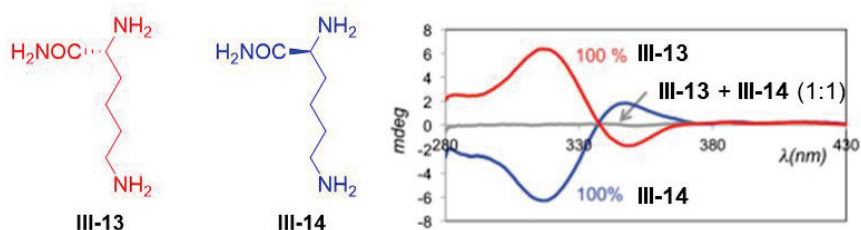


Figure 2 : Spectres de dichroïsme circulaire obtenus avec [**A**₄] et la lysine

A l'exception de la brique 1,4-dithiophénol **III-1**, les macrocycles majoritaires formés dans les autres chimiothèques sont tétramériques. Récemment, notre laboratoire a développé la synthèse du macrocycle **A**₃ à l'échelle du gramme à partir de la brique **A**.¹²⁸ En remplaçant le template spermine par la triamine **III-15**, seul un diastéréoisomère du dyn[3]arène est obtenu en complexe (**III-16**) 1:2 avec la triamine. Ce complexe a pu être isolé par précipitation et différentes analyses révélèrent une structure cylindrique avec deux triamines encapsulant le dyn[3]arène (Schéma 5).

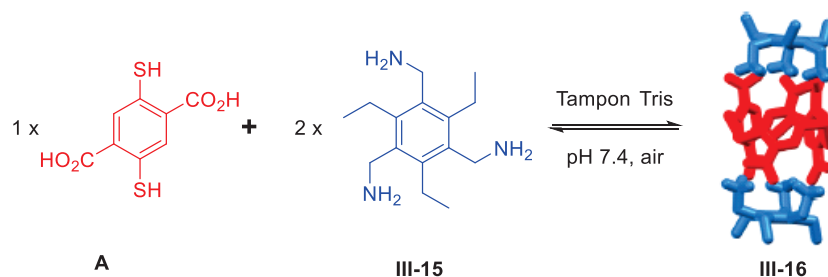


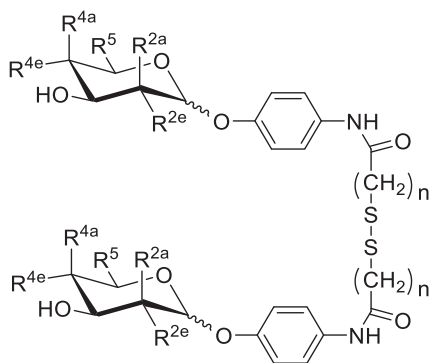
Schéma 5 : Formation d'un complexe dyn[3]arène : triamine

Récemment, l'étude d'une famille structurellement proche de dyn[n]arène utilisant comme unité monomérique des dérivés 1,4-phénylènediméthanethiol a donné accès à des dyn(2)arènes.¹⁸⁰

Ainsi, peu de travaux portant sur l'étude des *p*-cyclophanes dithiolés en CCD ont été effectués. Toutefois, les exemples développés par Vial *et al*¹²⁰ et notre laboratoire^{121,128,178,179} démontrent la possibilité de travailler dans des conditions physiologiques en présence de biomolécules. La CCD en présence de protéine semble donc accessible avec ce type de briques moléculaires.

III.1.3. ConA en chimie combinatoire dynamique

La première application de la CCD en présence de ConA revient à Ramström et Lehn.¹⁷¹ ConA reconnaissant les composés mannosylés, 6 homodimères liés par un pont disulfure et portant chacune un saccharide furent synthétisés (Figure 3).



Saccharide	α / β	R^{2a}	R^{2e}	R^{4a}	R^{4e}	R^5	n
A (Man/Man)	α	OH	H	H	OH	CH ₂ OH	3
B (GalC ₂ /GalC ₃)	β	H	OH	OH	H	CH ₂ OH	2
C (GalC ₃ /GalC ₃)	β	H	OH	OH	H	CH ₂ OH	3
D (Glc/Glc)	β	H	OH	H	OH	CH ₂ OH	2
E (Ara/Ara)	β	H	OH	OH	H	H	2
F (Xyl/Xyl)	β	H	OH	H	OH	H	2

Figure 3 : Dimères utilisés en CCD en présence de ConA

L'optimisation de la chimiothèque combinatoire dynamique fut effectuée en utilisant seulement quatre homodimères. Un temps d'équilibration long (14 jours) fut nécessaire pour atteindre l'équilibre thermodynamique, générant toutes les espèces homo- et hétérodimériques possibles. Les conditions permettant de bloquer l'échange de ponts disulfures furent investiguées, il s'avéra que la diminution du pH à 5 était suffisante pour stopper l'équilibration.

Pour travailler en présence de ConA, le groupe de Lehn utilisa cette dernière en version supportée sur billes de sépharose. Deux types d'équilibration furent étudiés : (1) la pré-équilibration de la chimiothèque suivie de l'ajout de ConA ou (2) l'équilibration en présence de ConA. Dans le premier cas, les 4 homodimères A, B, D et F furent placés en solution dans un tampon phosphate à pH 7.4. L'ajout de DTT permit d'initier l'échange entre les différentes molécules et cela pendant 14 jours. ConA supportée fut alors ajoutée dans le milieu pendant 1 h puis la chimiothèque fut filtrée, séparant ainsi les espèces non liées (filtrat) des espèces liées

(précipité). La suspension des billes de sépharose puis l'acidification du milieu (HCl 1M) permet de libérer les espèces fixées sur la lectine et de les caractériser. Une analyse par HPLC révéla que les espèces présentes dans le précipité étaient, comme attendu, l'homodimère de mannose (majoritaire) et les composés hétérodimériques comportant une moitié mannose. La répétition de cette procédure en présence de la lectine dès le début et en équilibrant la chimiothèque pendant 14 jours amena sensiblement aux mêmes résultats avec une faible amplification de l'homodimère de mannose. La complexification du système avec 6 homodimères ne changea rien aux précédentes observations et seules les espèces mannosylées restèrent fixées sur la lectine.

Cette première étude en présence de ConA montre la capacité de la CCD à pouvoir sélectionner parmi divers composés ceux qui possèdent une affinité pour la lectine. Toutefois, l'amplification reste très limitée et l'utilisation de ConA en version supportée est nécessaire.

L'emploi d'acylhydrazones a aussi été appliqué en présence de ConA. En 2004, Lehn *et coll* ont investigué la sélection par la lectine de son meilleur ligand parmi des molécules mono, di et trivalentes.¹⁷⁰ Pour cela, 6 saccharides porteurs d'un aglycone *para*-benzaldéhyde ainsi que 9 bras espaceurs portant entre 1 et 3 fonctions hydrazide ont été choisis. La chimiothèque combinatoire dynamique à l'équilibre pouvait exprimer jusqu'à 474 composés (Schéma 6).

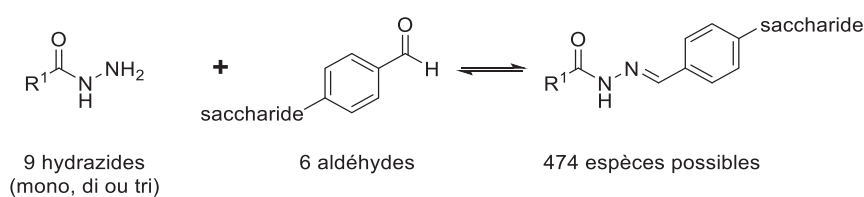


Schéma 6 : Formation réversible d'une acylhydrazone

Pour simplifier le système, une stratégie par déconvolution a été mise en place et l'affinité de chacune des sous-chimiothèques a été établie via des tests ELISA en présence de la lectine. Chaque chimiothèque a été analysée après une nuit d'équilibration à pH 4 dans un tampon formate d'ammonium. Après analyse, l'aldéhyde portant un mannose s'est logiquement montré essentiel à l'activité. Parmi les bras espaceurs, ce sont les composés comportant 3 fonctions hydrazides qui se sont révélés les plus affins. Pour valider ces résultats, une chimiothèque et ses sous-chimiothèques ne contenant que l'espèce mannosylée et les 9 hydrazides ont été testées. Une fois encore, les espèces résultant de la combinaison des tri-hydrazides et du mannose restent les plus affins. La synthèse du composé le plus actif **III-17** (Figure 4) a été effectuée et l'affinité a pu être déterminée par analyse de fixation. L'IC₅₀ dérivant de ces analyses montre une amélioration de l'affinité par un facteur 36 pour le composé **III-17** (22 μM) par rapport au composé monovalent de référence α-D-mannopyranoside de méthyle (800 μM). Ramström et Lehn démontrent ainsi que l'analyse des mélanges par HPLC n'est pas indispensable pour des études en présence de ConA. De plus, c'est le premier exemple employant ConA en version non supportée.

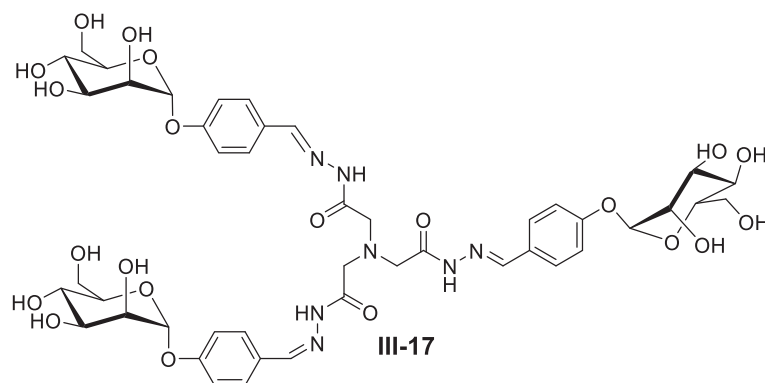


Figure 4 : Meilleur ligand de ConA découvert parmi les composés issus d'une chimiothèque combinatoire d'acylhydrazone

Une autre étude menée par le même groupe a permis d'identifier des ligands divalents de ConA.¹⁷² 14 Briques moléculaires monothiolées ont été synthétisées dont deux dérivant du mannose. Une chimiothèque de référence générant jusqu'à 105 homo- ou hétérodimères et 14 sous-chimiothèques où il manquait une des briques moléculaires de départ ont été testées en présence de ConA. L'équilibration a été menée pendant 24 h dans un tampon phosphate à pH 7. Des ajouts réguliers d'eau oxygénée ont permis l'accès rapide à l'équilibre sans qu'une suroxydation des thiols soit observée. L'analyse par déconvolution a révélé que les composés **III-18** et **III-19** étaient impliqués dans la liaison avec la lectine.

La synthèse des deux homodimères ainsi que de l'hétérodimère résultant de ces deux briques moléculaires a permis d'évaluer leurs affinités vis-à-vis de la lectine (Figure 5). L' EC_{50} de l'homodimère **III-20** et l'hétérodimère **III-21** ont été mesurées à 1.2 mM, très proche de celle du α -D-mannopyranoside de méthyle (1.1 mM), tandis que celle de l'homodimère **III-22** a été déterminée comme >20 mM.

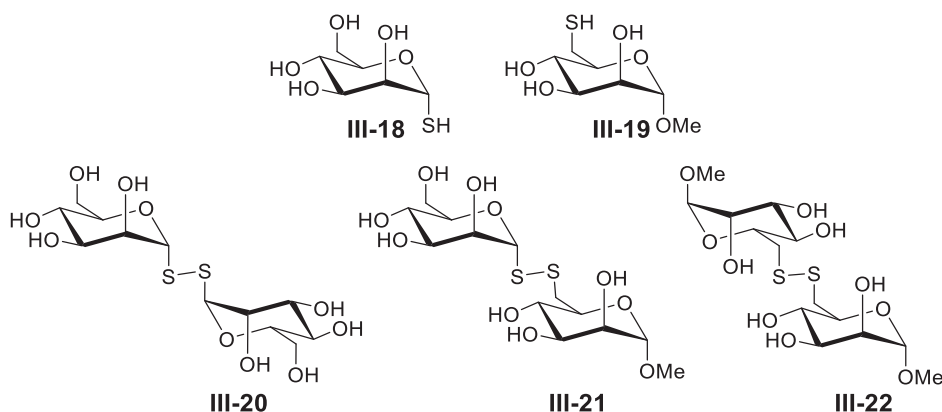


Figure 5 : Briques moléculaires nécessaires à l'activité et les dimères correspondants

Reeh et De Mendoza se sont inspirés des premiers travaux de Lehn avec ConA supportée pour investiguer la réversibilité de la formation de complexe de fer.¹⁷³ Pour vérifier le possible échange entre les ligands du complexe, deux complexes de Fe^{II} homoleptiques ont été synthétisés. Une distribution statistique entre les complexes homoleptiques et hétéroleptiques a été observée après équilibration (Schéma 7).

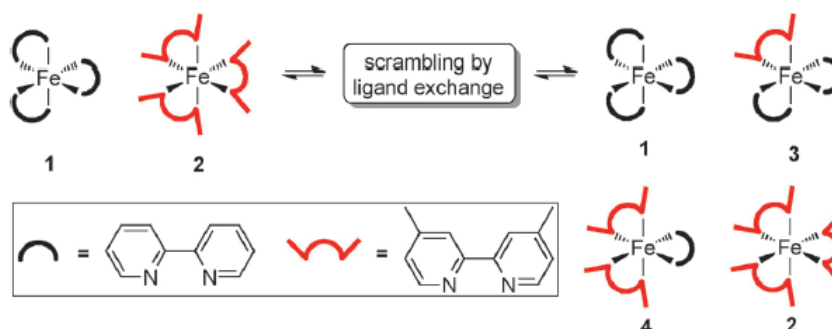


Schéma 7 : Vérification de la réversibilité de la formation d'un complexe de Fe^{II}

Après avoir validé la possibilité d'échange entre les ligands du complexe, leurs travaux se sont portés sur la synthèse de ligands pouvant reconnaître ConA. Pour cela, des noyaux bipyridine ont été modifiés en ajoutant des saccharides au bout d'un bras espaceur en positions 4,4'. Les ligands résultants, di-mannose (M), di-fucose (F) et di-galactose (G), ont ensuite été utilisés pour former les complexes homoleptiques de fer^{II} tricoordinés (MMM, FFF, GGG). L'échange entre les différents complexes fut suivi par HPLC et un temps d'équilibration de 14 jours à 5°C pour l'obtention d'une distribution statistique des différentes espèces a été déterminé (Schéma 8).

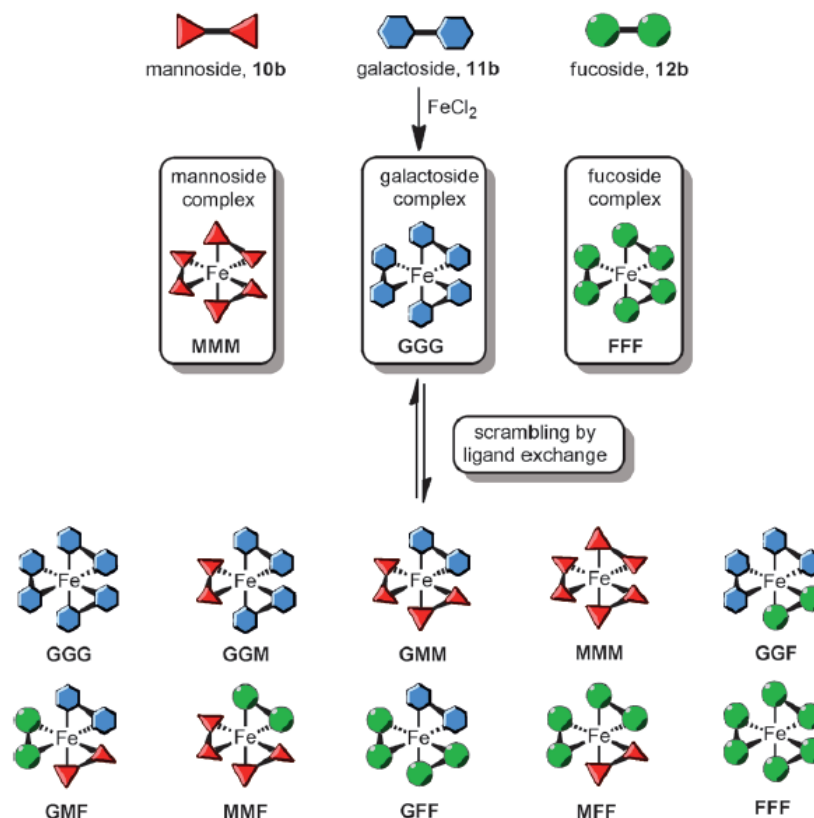


Schéma 8 : Mode opératoire pour la génération d'une chimiothèque à partir de 3 complexes homoleptiques contenant les saccharides mannose (M), fucose (F) et galactose (G).

En présence de ConA supportée sur bille de sépharose, les proportions des espèces à l'équilibre sont modifiées. Une séparation des espèces liées et non liées via filtration puis dénaturation de la protéine (HCl 0.5M) a prouvé que seuls les complexes comportant du mannose sont liés à la protéine. De plus, une amplification de 700% du complexe MMM est observée au détriment

des complexes hétéroleptiques mono- et dimannosylés. Ces travaux démontrent la possibilité d'appliquer la CCD avec des liaisons de coordination en présence de ConA.

Ces différents travaux constituent une base solide pour le développement de notre étude. A travers ces derniers, il est visible que ConA est capable de survivre aux conditions nécessaires à l'oligomérisation des disulfures. De plus, sa capacité à amplifier et sélectionner des composés parmi une chimiothèque combinatoire dynamique est établie.

III.2. CHIMIOTHEQUES COMBINATOIRES DYNAMIQUES ET OPTIMISATION DES CONDITIONS REACTIONNELLES

III.2.1. Préambule

Au cours de ce chapitre, de nombreuses structures macrocycliques et linéaires seront décrites. Dans un souci de clarté, les noms seront abrégés. La Figure 6 détaille la nomenclature utilisée au cours de ce chapitre. Les briques moléculaires composant les oligomères seront indiquées en gras par l'abréviation définie à la dernière page du chapitre précédent (Cf chapitre 2, Figure 11).

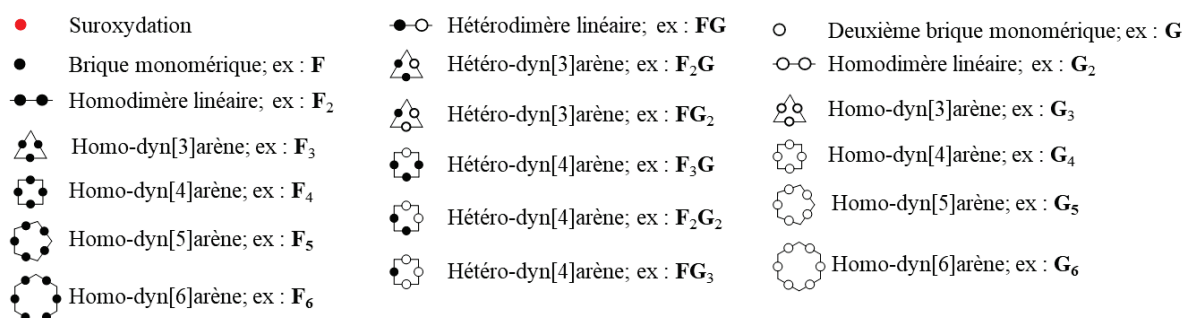


Figure 6 : Nomenclature des molécules utilisés au cours du chapitre

Au cours de notre étude, divers gradients, colonnes, solution tampon et HPLC ont été utilisés. Les informations relatives à ces derniers sont disponibles dans la partie expérimentale. Par mesure de clarté, les conditions expérimentales seront données dans la description de chaque figure par leur abréviation.

III.2.2. Etude de l'oligomérisation d'une brique moléculaire seule

III.2.2.1. Choix de la solution tampon

Avant d'étudier les premières chimiothèques combinatoires dynamiques, il a fallu déterminer les paramètres permettant de maximiser la proportion de cyclooligomères et minimiser les sous-produits éventuels. Conformément aux études antérieures, une concentration de travail de 4 mM en brique moléculaire a été choisie, menant généralement à une oxydation complète dans l'eau à pH neutre en 48 h. Le choix du tampon s'est révélé plus délicat. En effet, si LecA et LecB sont produites dans un tampon tris/HCl, ConA est le plus souvent étudiée dans un tampon phosphate. Toutefois, les informations de conservation de la lectine données par le fournisseur

stipulaient que celle-ci était stable 10 jours à 4°C dans un tampon Tris/HCl. Notre choix se porta donc sur ce dernier.

III.2.2.2 La suroxydation et la cyclisation S-N

L'étude de l'oligomérisation de la brique G a été effectuée à une concentration de 4 mM dans le tampon-A. L'équilibration a eu lieu sous agitation magnétique (400 tpm) à température ambiante. L'oxygène de l'air a servi d'oxydant pour former les ponts disulfures. Une analyse après 72 h d'équilibration démontra la disparition du monomère de départ. L'analyse HPLC-MS révéla que les molécules formées étaient issues d'une suroxydation totale de la brique moléculaire de départ et de la formation de composés comportant 2 atomes d'oxygène supplémentaires. La formation d'acide sulfénique (RS(=O)H) ou sulfinique (RSO_2H) fut supposée. De plus, des pertes de $m/z = 2$ et/ou 4 laissent imaginer une cyclisation intramoléculaire entre le soufre et l'atome d'azote de l'amide (Schéma 9).

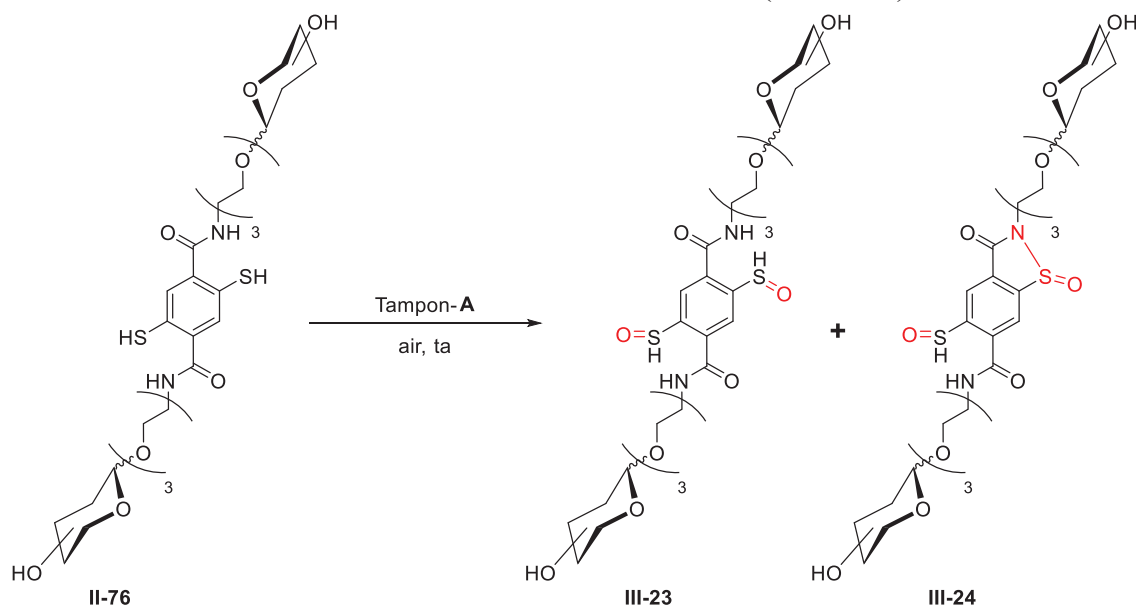
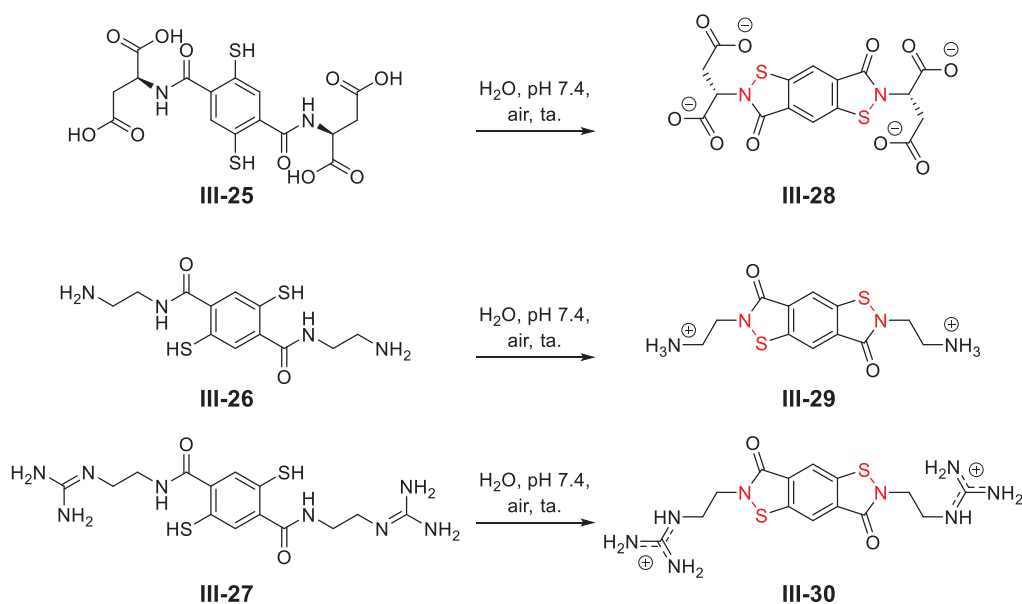


Schéma 9 : Représentation de potentielles molécules issues de la suroxydation des atomes de soufre et cyclisation S-N

Depuis ces travaux préliminaires, de nombreux autres exemples de pertes de $m/z = 2$ ou 4 ont été observés au laboratoire. Le doctorant Benjamin Ourri a été confronté à cette réactivité parasite et a mené une étude pour vérifier qu'une cyclisation S-N intramoléculaire était bien à l'origine de cette perte de masse.

Dans un premier temps, il a observé cette cyclisation sur diverses briques moléculaires (**III-25**, **III-26**, **III-27**) portant un amide en *ortho* du thiol (Schéma 10).



Différents solvants ont été testés tels le DMF, l'eau, ou le tampon Tris/HCl mais la cyclisation S-N était présente à chaque fois. En ayant supposé que celle-ci avait lieu entre le soufre et l'atome d'azote de l'amide, l'utilisation d'un amide tertiaire devait l'empêcher. La synthèse de deux de ces dérivés (**III-31** et **III-32**) fut effectuée et les résultats obtenus en CCD montrèrent que le phénomène de cyclisation était bien inhibé (Figure 7).

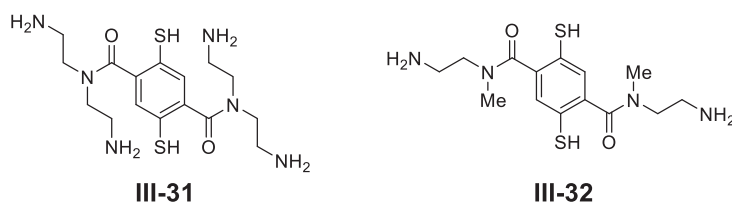


Figure 7 : Briques moléculaires possédant une fonction amide tertiaire

Les résultats de ces divers tests nous confortèrent dans l'idée que la perte de masse observée était bien la résultante d'une cyclisation S-N. Malgré tout, aucune caractérisation exacte de ces produits n'a été effectuée à ce jour et aucune analyse structurale prouve irréfutablement la présence de la liaison soufre-azote.

III.2.2.3. Suivi cinétique de la chimiothèque galactose **F**

Etant donné la dégradation totale de la chimiothèque en molécules suroxydées, un suivi beaucoup plus rapproché de la cinétique fut effectué sur la brique fucose divalente **F**. Au bout de 3 h, la disparition totale de la brique moléculaire initiale fut observée (Figure 8). Une analyse HPLC-MS permet d'identifier la formation de plusieurs dyn[3]- et dyn[4]arènes. Une légère dégradation de la chimiothèque était aussi observable avec l'apparition des premières molécules suroxydées.

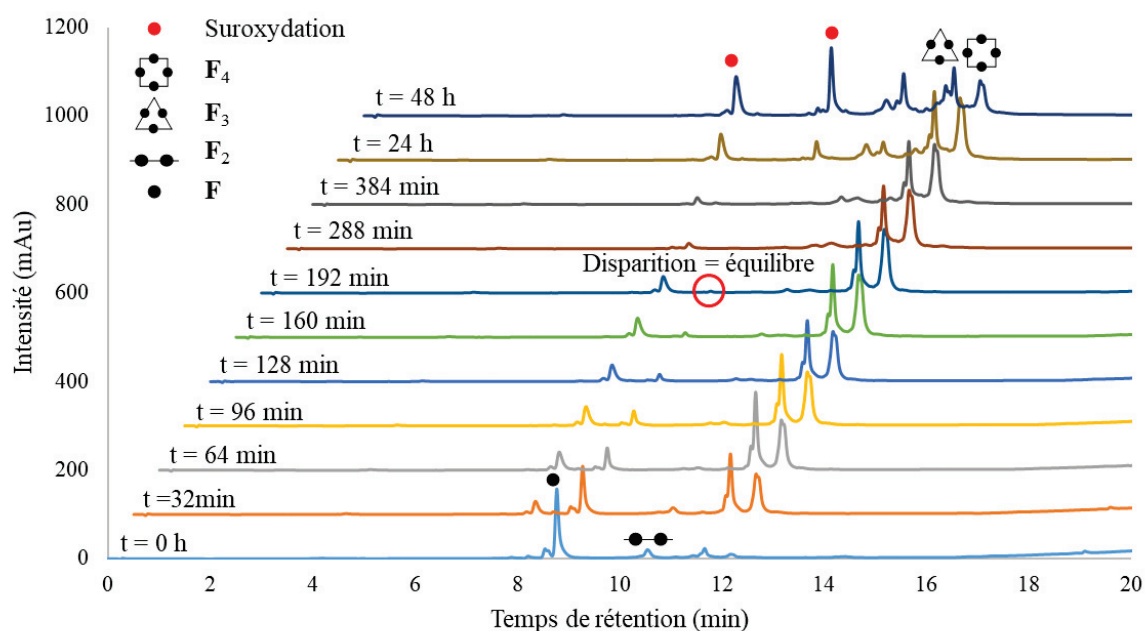


Figure 8 : Cinétique d'équilibration de **F**. Analyse : Grad-A, Col-A, Tampon-A, LC-A

Un suivi sur une plus longue durée montra la dégradation des espèces macrocycliques pour générer les acides sulféniques et sulfoniques préalablement identifiés. Contrairement à la brique diacide **A** développée par Vial *et al.*,¹²⁰ aucun dyn[5]arène ne fut observé. Comme prévu, différents diastéréoisomères pour chaque dynarène furent obtenus. Le suivi cinétique montra l'absence, à l'exception de traces de dimère, des espèces linéaires et la formation unique des macrocycles. A l'équilibre ($t = 192$ min), ces derniers représentent plus de 80% des espèces en solution (Figure 9), le reste se composant des espèces suroxydées.

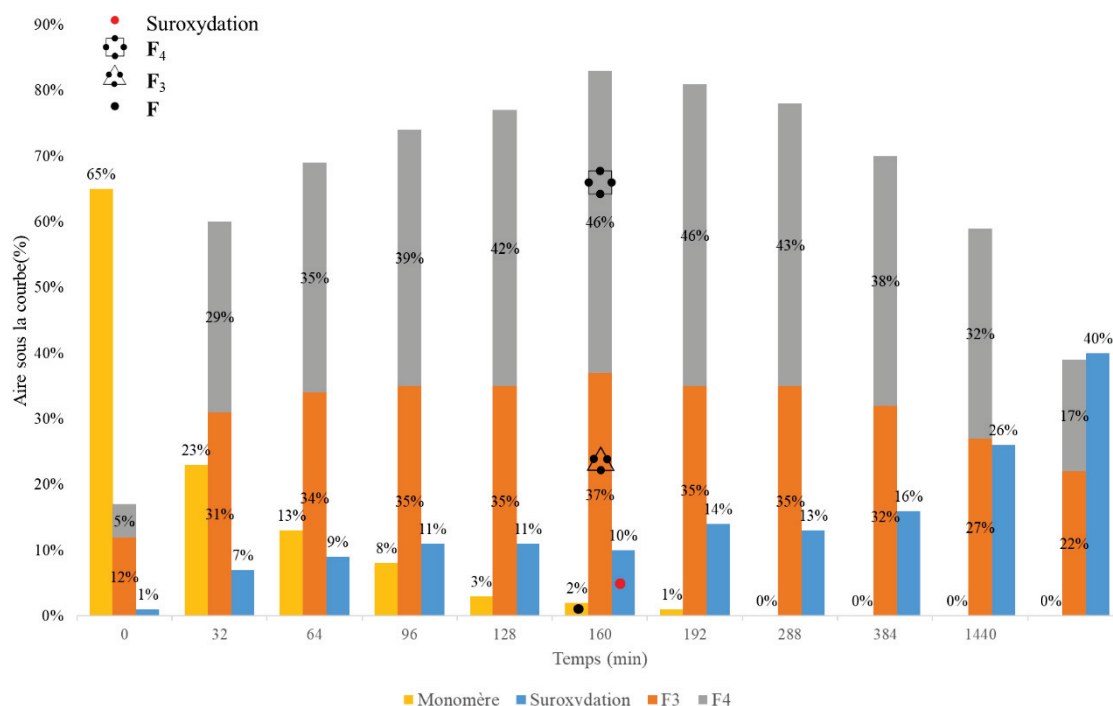


Figure 9 : Représentation sous forme d'histogramme des absorbances UV des différentes espèces formées en CCD par **F**. Analyse : Grad-A, Col-A, Tampon-A, LC-A

Ce suivi cinétique fut effectué pour les quatre briques moléculaires divalentes (**G**, **F**, **Glc**, **M**) et les résultats obtenus furent identiques avec une disparition de l'espèce de départ après 3 h d'équilibration et les macrocycles représentant plus de 80% des espèces présentes en solution à l'équilibre.

III.2.2.4. Variation des conditions d'équilibration pour limiter la suroxydation

Pour contrer la suroxydation des thiols, divers paramètres furent criblés avec la brique **F** (Figure 10).

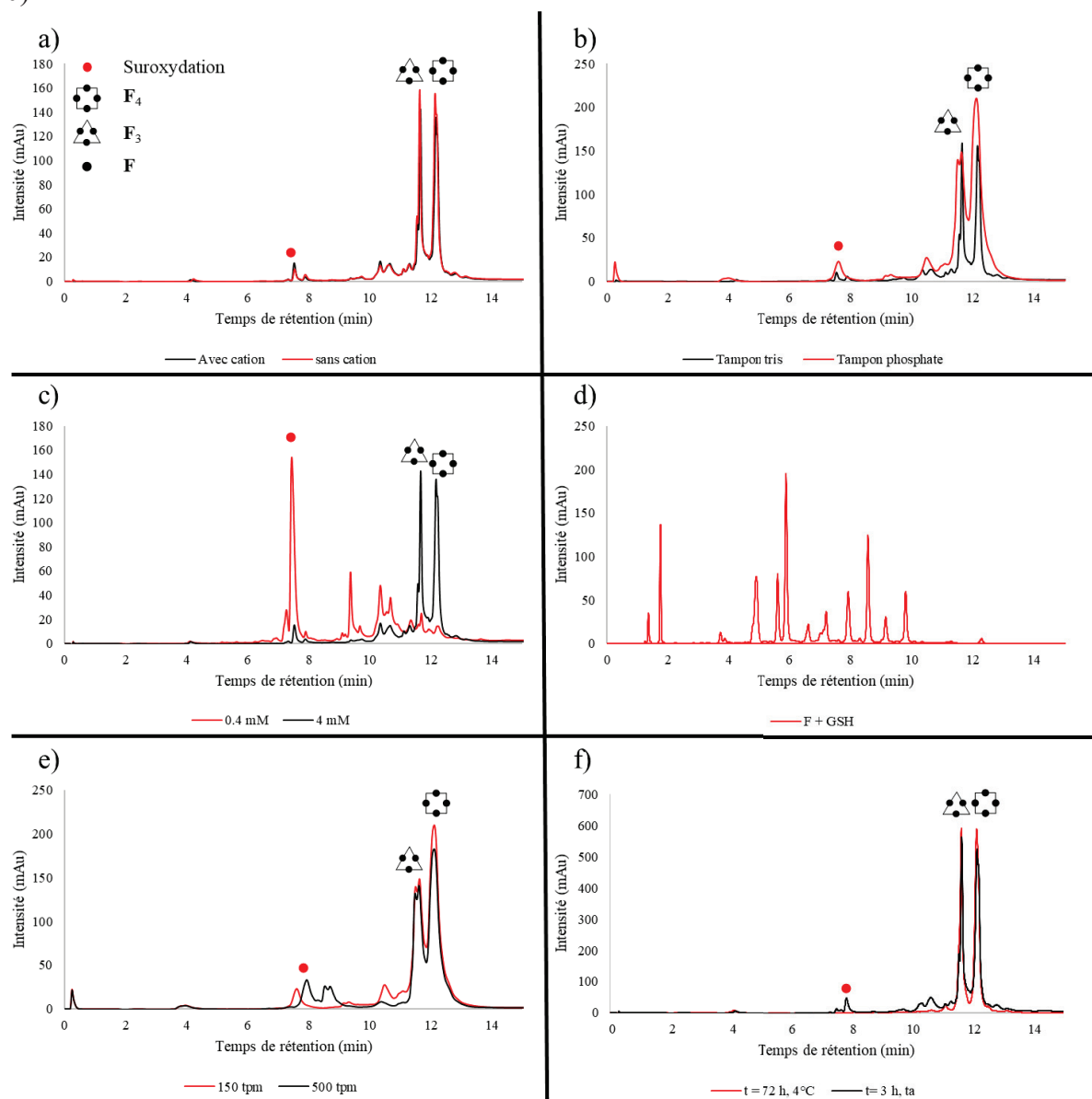


Figure 10 : Modifications des conditions d'équilibration de la brique **F**. a) Sans cation/sels (NaCl/CaCl₂). b) Tampon-B. c) Concentration de 0.4 mM en **F**. d) Ajout GSH. e) Vitesse d'agitation. f) Température. Analyse : Grad-A, Col-A, Tampon-A, LC-A

Premièrement, un nouveau tampon sans sels (NaCl/CaCl₂) a été étudié (Figure 10a) et les résultats obtenus entre une chimiothèque de référence et celle effectuée dans ce tampon dessalé furent identiques. Ces sels, ajoutés pour la stabilité de la lectine n'ont donc pas d'influence sur

la cinétique d'oligomérisation et la distribution d'espèces. Un changement pour un tampon phosphate ne modifia en rien la dégradation des espèces (Figure 10b). Une diminution par un facteur 10 de la concentration à 0.4 mM se révéla contre-productif. En effet, même si l'oligomérisation s'en trouva être plus rapide, la dégradation fut aussi accélérée (Figure 10c). L'ajout de glutathion a aussi été tenté en espérant une réduction de la suroxydation mais comme dans les travaux décrit par Balasubramanian *et coll.*,¹⁸¹ la formation d'espèce mixte entre le glutathion et notre brique moléculaire fut observé et aucun homodynarène ne fut formé (Figure 10d). La modification de l'agitation n'eut elle non plus aucun impact sur la cinétique et la formation/dégradation des espèces (Figure 10e).

Enfin, une diminution de la température à 5°C permit l'obtention d'une chimiothèque sans suroxydation (Figure 10f). Le temps nécessaire à la disparition du monomère fut augmenté (3 jours) mais aucune suroxydation ne fut détectée et ce ne fut seulement qu'après 26 jours qu'un début de dégradation fut observé.

Ainsi, les meilleures conditions d'équilibration furent définies comme une chimiothèque combinatoire dynamique avec une brique moléculaire à 4 mM, dans le tampon-A à 5°C et sans agitation.

III.2.3. Chimie combinatoire dynamique en présence de ConA

III.2.3.1. Méthodologie de travail

Une fois les meilleures conditions d'équilibration établies, il était possible de travailler en présence de ConA. Néanmoins, plusieurs questions subsistaient sur la manière de travailler en présence de la lectine. Les lectines de *Pseudomonas aeruginosa* n'étant pas disponible en versions supportées, il était nécessaire de développer un système modèle sur ConA non supportée. L'avantage de ce dernier est qu'il ne modifie pas la protéine pour pouvoir l'attacher sur des billes de sépharose. Toutefois, cette méthodologie soulevait plusieurs questions.

(1) Comment être sûr que les espèces liées à ConA étaient bien relarguées en solution ?

Plusieurs méthodes existent pour relarguer les espèces liées à une protéine. La première consiste à dégrader thermiquement la structure de la protéine en la chauffant. Cette technique pose toutefois de nombreux soucis pour la CCD car l'équilibre étant thermodynamique, changer ce paramètre peut modifier la distribution d'espèces et altérer les résultats. Une deuxième méthode consiste à appliquer un choc salin en ajoutant une concentration forte (molaire) de sels, par exemple le chlorure de guanidinium. Cette technique fut essayée vis-à-vis des lectines LecA et LecB mais aucune dégradation de la protéine ne fut observée. La troisième technique utilise un ligand compétiteur. L'ajout d'un grand excès de ce dernier va venir déloger les molécules liées à la lectine. Toutefois, cette méthodologie implique que le ligand compétiteur ait une affinité supérieure ou proche des oligomères formés pour pouvoir les remplacer dans le site de liaison de la lectine. Ne connaissant pas l'affinité des molécules formées, il est difficile de prouver que toutes les ligands sont relargués. La dernière stratégie visant à abaisser le pH permet de figer la chimiothèque et de dégrader la lectine de manière simultanée. Cette variation de pH protone les

thiolates et bloque la réaction d'échange de ponts disulfures. Cette dernière méthode a été sélectionnée car elle avait déjà été employée par les groupes de Lehn et de De Mendoza.^{171,173}

(2) Comment déterminer les espèces liées et ainsi les meilleurs ligands de ConA ?

La question de l'identification des espèces liées restait toutefois problématique. Ne travaillant pas en milieu supporté, il était impossible de séparer les espèces en solution des espèces liées. Toutefois, l'observation des amplifications relatives entre une chimiothèque de référence et une chimiothèque en présence de lectine permettrait d'identifier les meilleurs ligands. La modification des concentrations des briques moléculaires et de conA nous permettrait d'estimer que les espèces les plus amplifiées sont les plus affines. Un isolement des composés identifiés serait nécessaire pour vérifier cette supposition.

(3) A quelle concentration travailler ?

La concentration posait problème. Tout d'abord, la lectine présente une solubilité assez faible (~5 mg/mL) dans la solution tampon à température ambiante et il n'était pas possible de travailler à de fortes concentrations. Une concentration de travail en brique de 0.4 mM fut choisie pour obtenir une oligomérisation rapide. Toutefois, des tests ayant montré la dégradation rapide des chimiothèques à 0.4 mM, même à 4°C, il fut décidé de travailler à température ambiante.

(4) A quel moment ajouter la lectine ?

La question du moment de l'ajout de la lectine était problématique. En effet et bien que Lehn ait démontré la stabilité de ConA en solution pendant 14 jours,¹⁷¹ la dégradation partielle de nos chimiothèques peu concentrées (0.4 mM) nous obligeait à envisager une cinétique d'oligomérisation rapide à température ambiante pour limiter au maximum la détérioration des macrocycles formés en espèces suroxydées. L'ajout de la lectine en fin d'oligomérisation ne semblait donc pas pertinent puisque la chimiothèque prendrait plus de temps à équilibrer, entraînant plus de dégradation. Un ajout en début d'équilibration apparaissait donc comme la solution la plus adaptée pour notre problématique.

III.2.3.2 Chimiothèque **M**:ConA

Une première chimiothèque en présence de ConA fut effectuée à RT. La brique **M** fut dissoute dans le tampon-A à une concentration de 4 mM. Partant de cette solution mère, deux chimiothèques à 0.4 mM **M** furent équilibrées. La première, de référence, ne contenait que la brique **M** tandis que la deuxième comportait **M** et ConA dissoute à 0.4 mM. Dès la mise en présence de ConA et de la brique **M**, le mélange se troubla et des agrégats se formèrent. L'équilibration fut tout de même menée et les deux chimiothèques furent analysées après 3 h. La chimiothèque de référence fut injectée en HPLC après une dilution par un facteur 2 dans HCl 1M et une distribution classique des dyn[3]- et dyn[4]arènes fut obtenue. Pour la chimiothèque avec ConA, les agrégats furent séparés du surnageant par centrifugation (10 000 tpm, 2 min). Le précipité obtenu fut dissout dans un mélange Tampon-A/HCl 1M (1:1, v/v) à

une concentration de 0.4 mM. ConA se solubilisa totalement et cette solution put être analysée par HPLC. Le surnageant fut dilué par un facteur 2 dans HCl 1M et analysé. Les chromatogrammes obtenus pour le précipité et le surnageant furent additionnés et comparés à celui de la chimiothèque de référence (Figure 11)

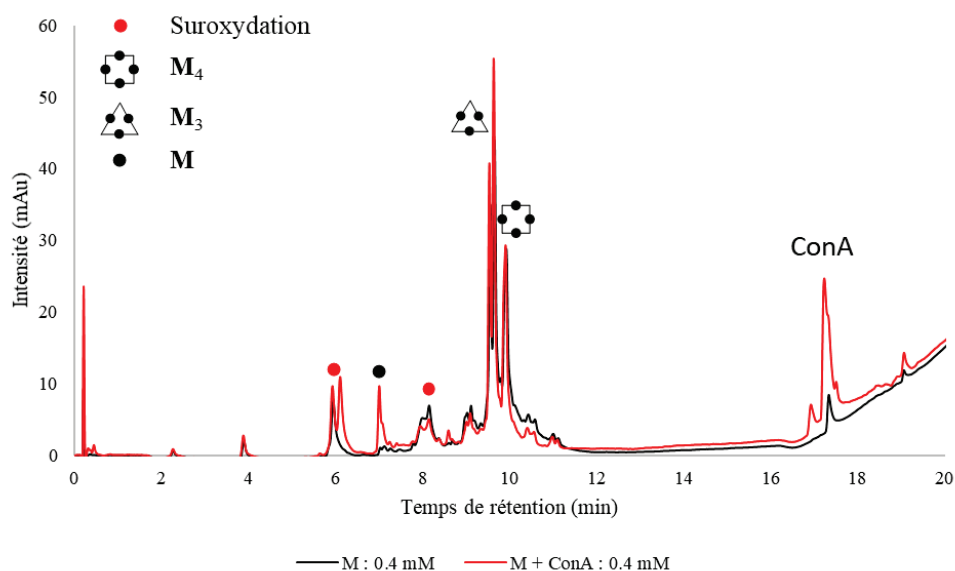


Figure 11 : Comparaison de deux chimiothèques équilibrées 3 h à t.a. dans le tampon-A. En noir : chimiothèque de référence de **M** (0.4 mM). En rouge : chimiothèque de **M** (0.4 mM) en présence de ConA (0.4 mM). Analyse : Grad-A, Col-A, Tampon-A, LC-A

Aucune différence significative ne fut observée entre la chimiothèque de référence et celle en présence de ConA. Toutefois, les dynarènes formés possédant des valences élevées (6 et 8), la différence d'affinité pour la lectine n'était potentiellement pas suffisante pour obtenir des amplifications discernables en HPLC. Deux stratégies furent alors investiguées : (1) Réduire la valence des briques moléculaires, i.e. utiliser des composés monovalents ou (2) utiliser une deuxième brique moléculaire ne possédant pas d'épitope de la lectine, générant ainsi des hétéroglycodyn[n]arènes à la valence réduite.

III.2.4. Chimiothèques combinatoires dynamiques mixtes

Dans un premier temps, nous avons générer des chimiothèques mixtes. Plusieurs choix de briques moléculaires ne possédant pas d'épitope de conA étaient possibles : les briques **A**, **P**, **G** ou **F**. Pour l'étude des chimiothèques combinatoires mixtes, seuls les dynarènes seront quantifiés, 100% représentant la somme de ces espèces (espèces suroxydées non quantifiées car en proportions minoritaires et indépendantes du type de brique). Pour obtenir les concentrations relatives des dynarènes, nous avons supposé que la formation du lien disulfure ne modifiait pas l'absorbance de chaque unité monomérique en UV. Ainsi, la concentration en macrocycle sera obtenue en divisant l'absorbance mesurée par le nombre d'unité monomérique contenu dans l'objet et rapporté à l'absorbance d'un monomère

III.2.4.1. Chimiothèque M:A

Pour débiter notre étude de chimiothèques mixtes, nous avons travaillé avec un mélange de **M** et **A**. **A** a longuement été étudiée au sein du laboratoire et ses macrocycles ont déjà été identifiés. Une chimiothèque constituée d'un mélange de **M**:**A** (4 mM, 1:1) a été effectuée et une analyse par HPLC-MS a révélé la formation d'hétérodynarènes (Figure 12).

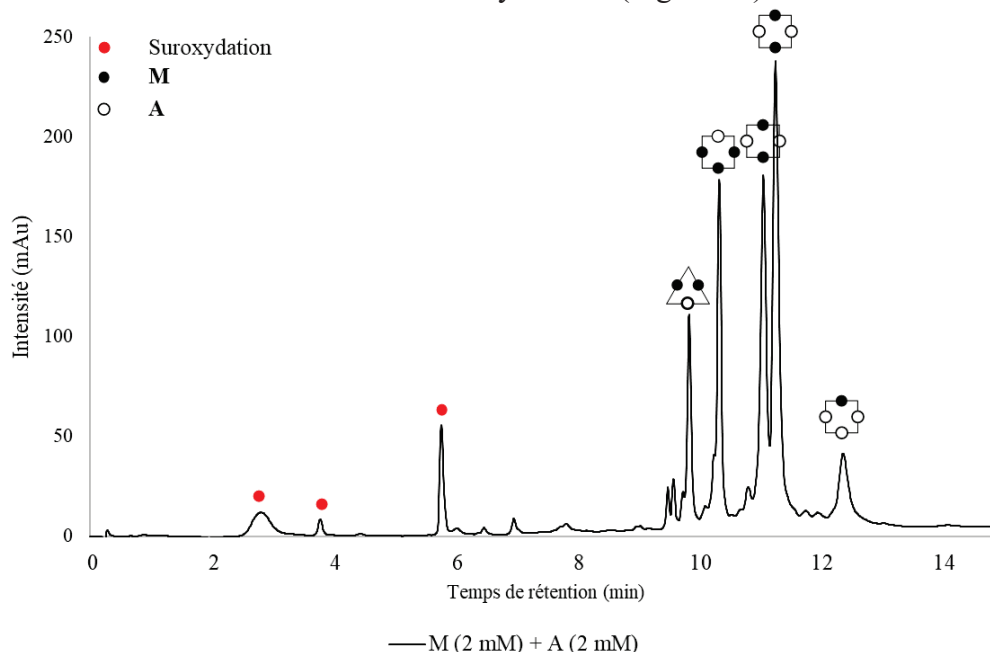


Figure 12 : Chimiothèque à l'équilibre (3 h) d'un mélange **M**:**A** (4 mM, 1:1). Analyse : Grad-**A**, Col-**A**, tampon-**A**, LC-**A**

Malencontreusement, une chute drastique de l'absorbance totale et donc de la quantité totale de matériel analysé laisse supposer que certains oligomères ne sont pas élués et que le chromatogramme obtenu n'est pas représentatif de la distribution totale d'espèces à l'équilibre. Les analyses de cette chimiothèque mixte n'ont donc pas été poussées plus loin.

III.2.4.2. Chimiothèque P

La brique glycol **P** étant nouvelle et n'ayant jamais été utilisée en CCD, sa cinétique d'oligomérisation a été étudiée. Le monomère décroît rapidement pour disparaître après 5 h d'équilibration en générant les dyn[3]- et dyn[4]arènes. Cependant, un précipité se forme dans les conditions réactionnelles et l'absorbance totale diminue au cours de l'avancement de l'équilibration. Le précipité a été séparé par centrifugation puis dissout dans du DMSO pour être analysé par HPLC (Figure 13a). Contrairement au surnageant (Figure 13b), aucune trace de suroxydation n'est obtenue dans le solide récupéré. De plus, les proportions entre les dynarènes varient entre le précipité et le surnageant. En effet, ce dernier est composé à 51% du dyn[3]arène et 49% dyn[4]arène. Dans le cas du précipité, le tétramère est sur-représenté (59 %) par rapport au trimère cyclique (41%). Néanmoins, la précipitation des macrocycles de **P** pose des problèmes au niveau de la CCD. En effet, ceux-ci sortent de l'équilibration et cette brique moléculaire n'est donc pas adaptée pour générer des chimiothèques mixtes

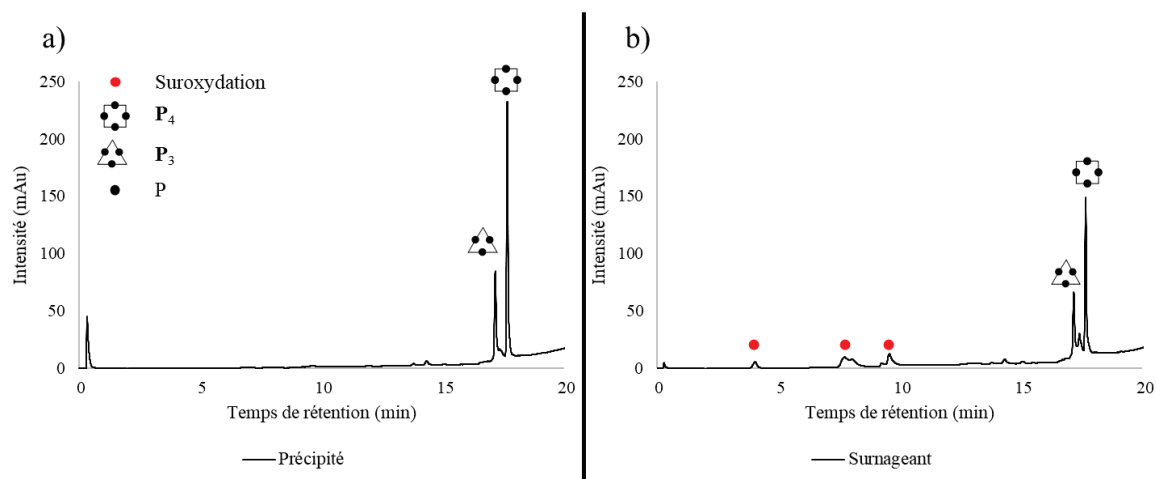


Figure 13 : Chimiothèque combinatoire dynamique de **P** à 4 mM. a) Chromatogramme du précipité. b) Chromatogramme du surnageant. Analyse : Grad-A, Col-A, Tampon-B, LC-A

III.2.4.3. Chimiothèque M:F

Suite aux échecs consécutifs des briques **A** et **P**, nous nous sommes orientés vers des mélanges composés de plusieurs briques moléculaires saccharidiques. ConA possédant une affinité pour le glucose, la brique moléculaire **Glc** n'a pas pu être utilisée. Le choix portait entre les dérivés fucose **F** et galactose **G**. Les temps de rétention des dyn[n]arènes galactosylés (**G**₃:**G**₄) et mannosylés (**M**₃:**M**₄) étant très proches, une identification des pics en HPLC-MS serait extrêmement compliquée. De plus, les deux briques moléculaires ont des masses identiques et l'identification des composés issus d'une chimiothèque mixte se révélerait impossible via une analyse MS. Le fucose étant un saccharide 6-déoxy, une différence de $m/z = 16$ Da est obtenue avec le mannose, soit une différence de $m/z = 32$ Da pour nos composés divalents. Ainsi, des différences significatives de m/z en spectrométrie de masse nous permettaient de différencier les différents homo- et hétérodynarènes. En sus, le caractère déoxy du fucose implique des temps de rétention différents des trois autres saccharides et une variation de polarité des homo- et hétérodynarènes qui rendra possible une identification par HPLC. Ainsi, la brique **F** fut sélectionnée comme partenaire pour réduire la valence de nos oligomères cycliques. Une chimiothèque mixte **M** et **F** (4 mM, 1:1) fut réalisée dans les conditions optimales précédemment déterminée (4°C sans agitation dans le Tampon-A) et un gradient optimisé (Grad-B) pour séparer les différents dynarènes. Ce dernier ne permet pas de suivre la disparition des monomères et il n'est utilisé que pour l'analyse de la chimiothèque mixte à l'équilibre. Une analyse HPLC-MS démontra la séparation des différents macrocycles issus de la chimiothèque mixte et montra la présence de toutes les espèces homo- et hétérodyn[3,4]arènes (Figure 14). En analysant le chromatogramme, il est visible que les trimères éluent plus vite que les tétramères. De plus, les composés les plus mannosylés sont les premiers élués. Enfin, une séparation des divers diastéréoisomères de chaque macrocycle est observée.

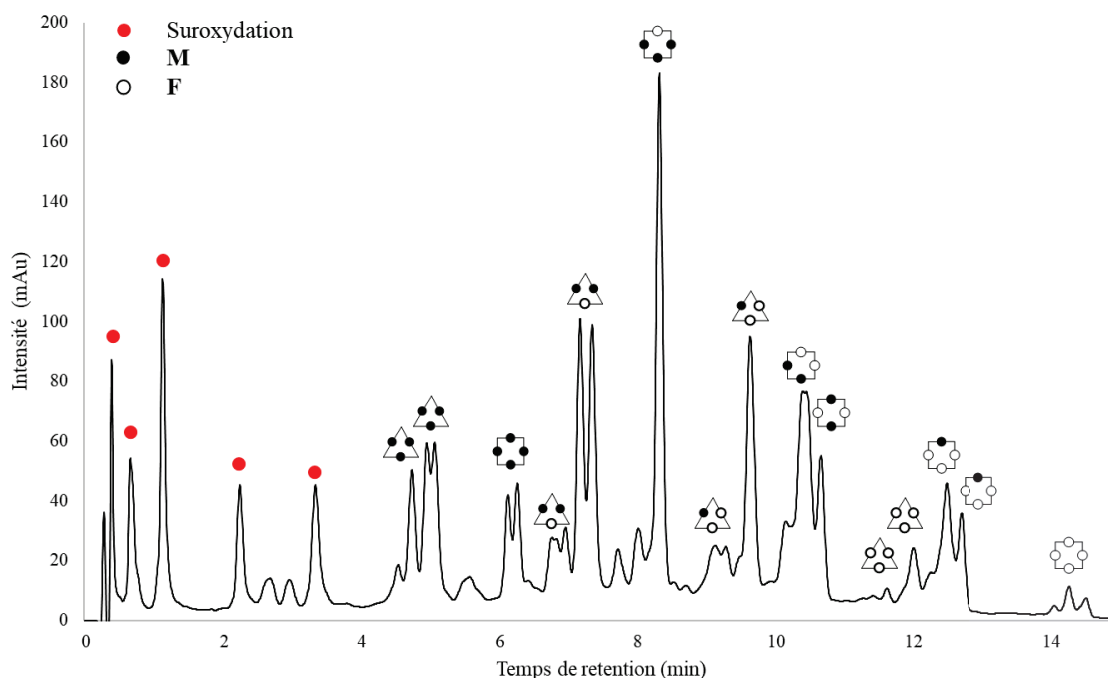


Figure 14 : Chimiothèque mixte **M:F** (4 mM, 1:1) après 13 jours d'équilibration à 4°C sans agitation dans le tampon-A. Analyse : Grad-B, Col-A, tampon-A, LC-A

III.2.4.4. Chimiothèque **M:F:ConA**

III.2.4.4.1 **M:F** équimolaire

La génération d'une chimiothèque **M** et **F** donnant accès à tous les homo- et hétérodyn[n]arènes, une méthodologie pour travailler en présence de ConA a été développée. La Figure 15 décrit schématiquement cette méthodologie. Suite aux problèmes de précipitation de nos composés en présence de la lectine, une pré-équilibration en absence de celle-ci nous a paru pertinente pour ne pas ralentir la cinétique et ainsi éviter la suroxydation des thiols. Cette pré-équilibration a été menée à une concentration totale en brique moléculaire **M:F** de 4 mM. Après 3.5 h, deux chimiothèques à 0.4 mM ont été préparées à partir de celle à 4 mM. La première, de référence, était composée d'un mélange **M:F** (0.4 mM, 1:1). La deuxième résultait du mélange de **M:F** (0.4 mM, 1:1) et ConA (0.4 mM). Encore une fois, un précipité fut observé dès la mise en présence des macrocycles issus de la combinaison de **M:F** et ConA. L'équilibration de la chimiothèque de référence fut suivie par HPLC et la disparition des monomères fut constatée après 2h15, soit un temps total d'équilibration de 5h45. La chimiothèque de référence fut stoppée en la diluant par deux avec HCl 1M et injectée en HPLC (Echantillon 1). Pour celle en présence de ConA, le précipité fut séparé du surnageant par centrifugation (10 000 tpm, 2 min). Ce dernier fut dilué par deux avec HCl 1M et injecté en HPLC (Echantillon 2). Enfin, le solide fut dissout dans un mélange HCl 1M:Tampon tris (1:1 v/v) dans le même volume total que la bibliothèque de référence et le surnageant (Echantillon 3). Via cette méthodologie, l'addition des intensités de chaque oligomère présent dans le surnageant et/ou le précipité permettait de les comparer avec celles de la chimiothèque de référence. Les espèces présentes en solution ont de nouveau été caractérisées par HPLC-MS et un macrocycle où il manquait un saccharide a pu être identifié. Il est dénommé **MF**_{3/2} et

correspond au macrocycle **MF**₂ sur lequel un fucose est manquant. De plus, l'hétérodimère linéaire **MF**- est aussi présent en petites quantités.

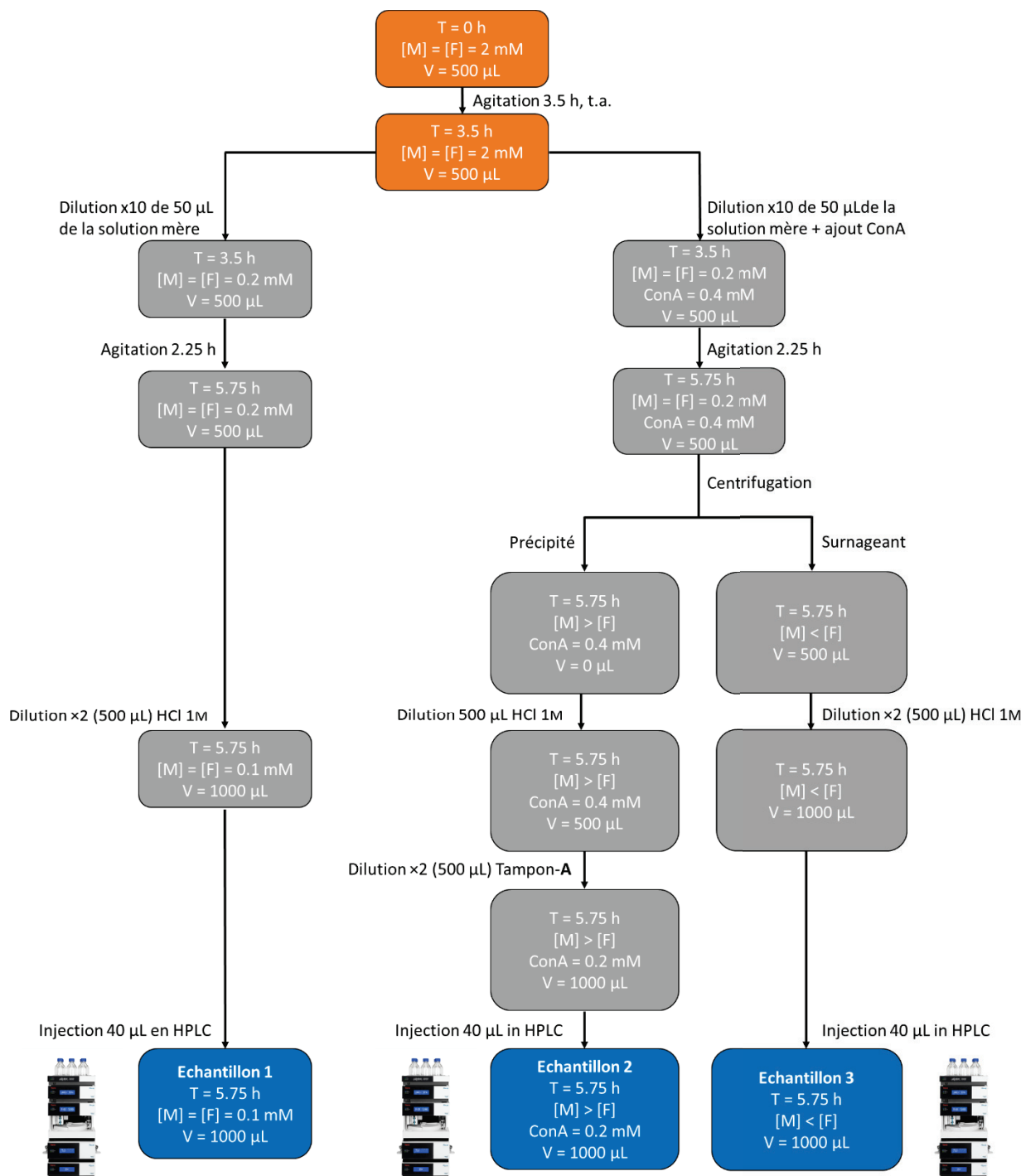


Figure 15 : Méthodologie pour l'équilibration des chimiothèques **M:F:ConA**.

En comparant les trois chromatogrammes issus de la référence (Figure 16a, Echantillon 1), du précipité (Figure 16b, Echantillon 2) et du surnageant (Figure 16c, Echantillon 3), une amplification des homooligomères est visible en présence de ConA. Le surnageant est composé ultra majoritairement des homooligomères de fucose tandis que le précipité contient les

macrocycles les plus riches en mannose : **M₃**, **M₄**, **M₂F** et **M₃F**. Un phénomène de sélection par la lectine est donc bien présent et valide la stratégie employée.

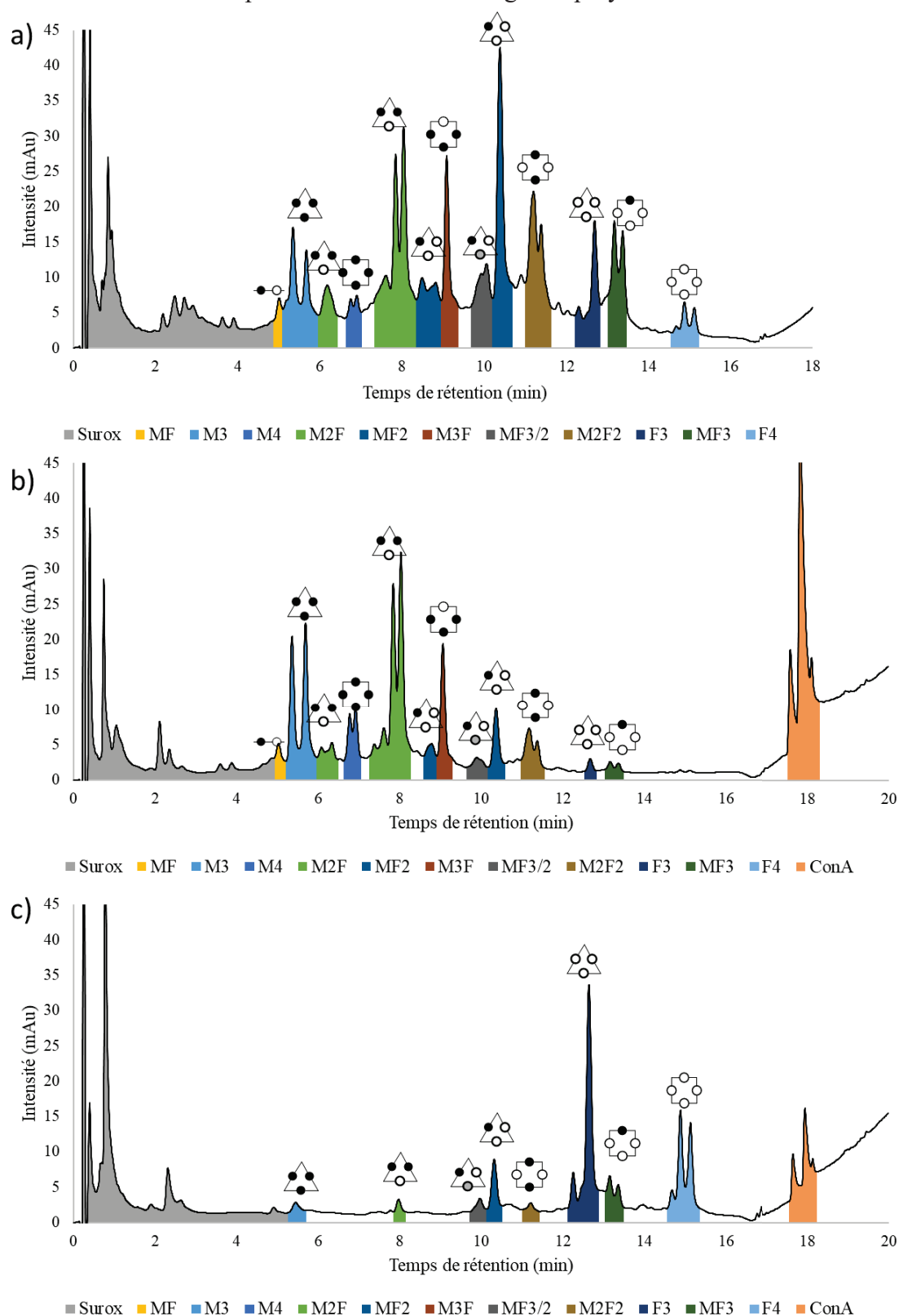


Figure 16 : Chromatogrammes des chimiothèques. a) de référence **M:F** (Echantillon 1). b) du précipité **M:F:ConA** (Echantillon 2). c) du surnageant **M:F:ConA** (Echantillon 3). Analyse Grad-B, Col-A, Tampon-A, LC-A

Un triplicat de cette expérience a été effectué et l'amplification relative de chacun des glycodynarène a pu être obtenue (Figure 17). Il apparaît clairement que la présence de ConA mène à la dissociation des hétérodynarènes pour restaurer les homodynarènes. L'amplification de ces derniers varie entre 70 et 270%. Ce résultat était attendu puisque seul le mannose est reconnu par ConA. Celle-ci va réarranger les dyn[n]arènes pour générer les espèces les plus mannosylées M_n laissant de côté la brique **F** qui va former ses propres oligomères F_n .

Plus étonnant est la stabilité des macrocycles M_2F et M_3F . La concentration de ces deux hétérodynarènes ne varie quasiment pas entre la chimiothèque de référence et celle en présence de ConA. Le composé M_2F est même l'espèce la plus présente à la fin de l'équilibration. Une première explication voudrait qu'une valence de 4 soit suffisante pour créer un ligand assez affin avec la lectine pour qu'elle ne soit pas à même de le différencier vis-à-vis d'autres ligands possédant des valences supérieures. Toutefois, le fait que le composé M_2F_2 décroisse fortement (-54%) semble exclure cette possibilité. Une deuxième explication provient de la stabilité intrinsèque du macrocycle. En effet, les macrocycles de taille 3 sont fortement favorisés dans cette chimiothèque (66% du total des espèces) et leur plus grande stabilité pourrait expliquer la résistance de M_2F . Une dernière explication provient de l'interconversion incessante du système. M_2F et M_3F sont des points de passage pour accéder aux homodynarènes de **M** et ainsi, ils se retrouvent sur-représentés. Le dernier point à relever est la bien meilleure amplification du macrocycle M_4 par rapport à celle de M_3 (+ 69% vs + 267%). Ceci laisse supposer que M_4 est plus affin pour la lectine.

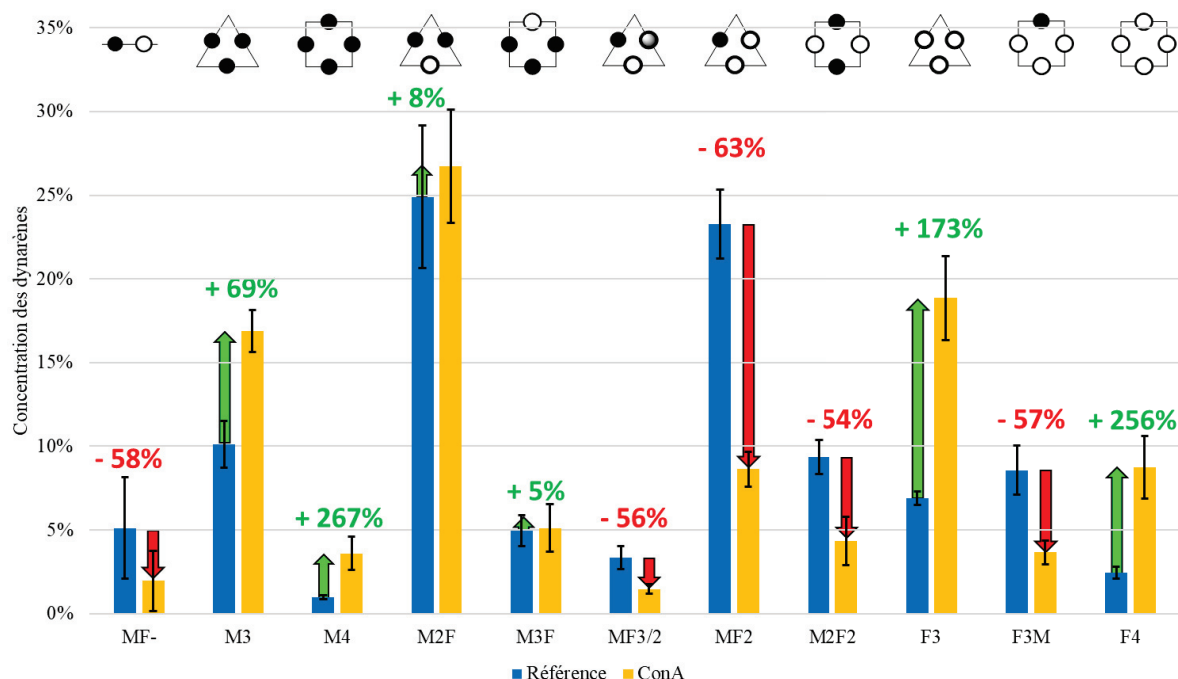


Figure 17 : Amplifications relatives des espèces formées entre une chimiothèque de référence **M:F** (0.4 mM, 1:1) et **M:F** (0.4 mM, 1:1) + ConA. (0.4 mM). Analyse Grad-B, Col-A, tampon-A, LC-A.

III.2.4.4.2 *M:F non-équimolaire*

Pour vérifier les résultats obtenus en CCD, plusieurs paramètres ont été modifiés. Le premier d'entre eux a visé la modification de la concentration des briques moléculaires **M** et **F**. Jusqu'à présent, les deux dérivés saccharidiques se trouvaient à la même concentration (2 ou 0.2 mM chacun). Une augmentation de la quantité de fucose par rapport au mannose permettrait de vérifier le phénomène de dissociation des hétérodynarènes pour former les homodynarènes. De plus, le milieu étant pauvre en mannose, les amplifications observées devraient être plus importantes que dans le cas où les deux briques sont équimolaires.

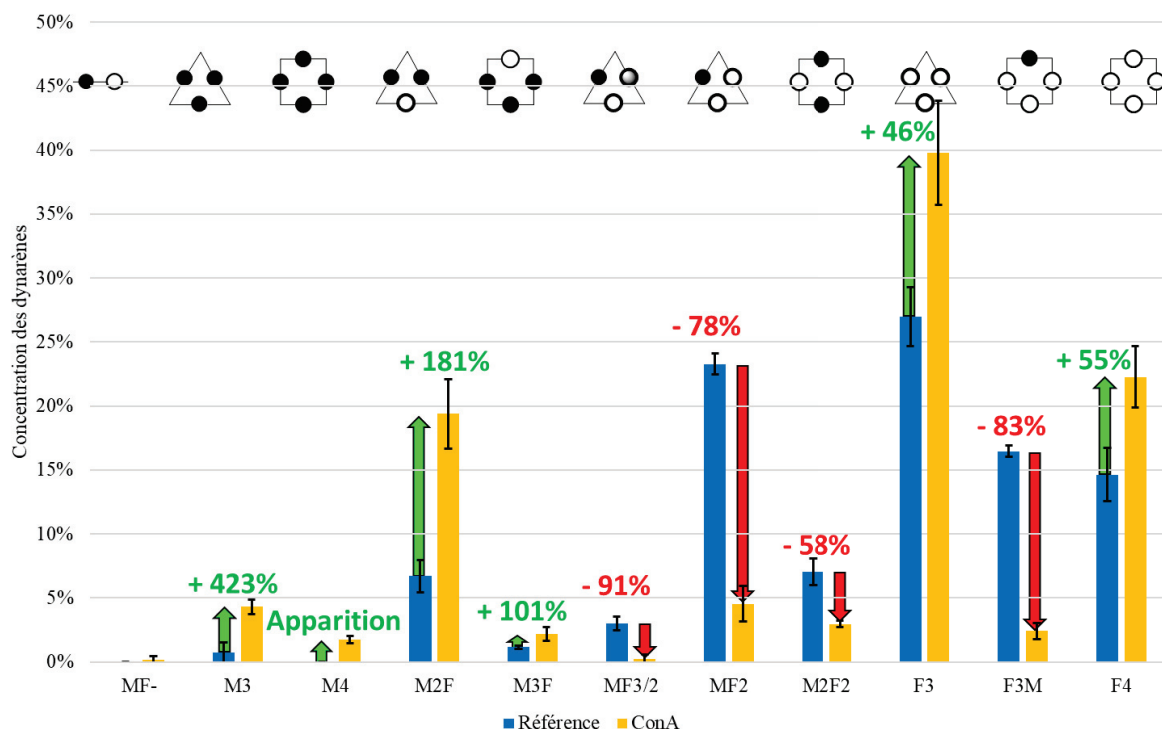


Figure 18 : Amplifications relatives des espèces formées entre une chimiothèque biaisée **M:F** (0.4 mM, 1:3) et **M:F** (0.4 mM, 1:3) + ConA. (0.4 mM). Analyse Grad-B, Col-A, Tampon-A, LC-A.

Une chimiothèque avec un ratio **M:F** de 1:3 fut donc testée en absence (référence) et en présence de ConA selon le même mode opératoire que celui décrit pour la chimiothèque équimolaire. Comme précédemment, l'ajout de ConA en présence des oligomères amena à la formation d'agrégats qui furent séparés par centrifugation. L'expérience fut tripliquée et les amplifications relatives des dynarènes déterminées (Figure 18). Comme attendu, la chimiothèque de référence amena à la formation majoritaire de dynarènes riches en fucose. La concentration de la brique **M₂F** qui était précédemment la plus importante en solution diminua fortement (25%→6%), la concentration en trimère **M₃** fut divisée par 10 (10%→1%) et le macrocycle **M₄** ne fut plus détecté. Néanmoins, en présence de la lectine, de très fortes amplifications furent obtenues pour les dérivés riches en mannose. Elles varièrent entre + 101% et + 423% et permirent l'apparition du **M₄**, non-détecté dans la chimiothèque de référence. La chute en concentration des différents hétérodynarènes comportant 2 ou 3 unités monomériques **F** fut encore plus drastique avec la quasi disparition de certaines espèces (-80 à -91%).

Cette chimiothèque biaisée en quantité de mannose montre de manière spectaculaire le phénomène de sélection et d'amplification des espèces par ConA. En effet, même si les composés amplifiés ne représentent qu'une petite partie de la chimiothèque à l'équilibre, de très fortes amplifications pour les espèces riches en mannose sont observées et le macrocycle **M**₄, absent de la chimiothèque de référence, est exprimé en présence de la protéine. Les amplifications obtenues sont suffisantes pour identifier les meilleurs ligands de ConA. Ces résultats valident la stratégie employée et démontrent que la lectine est capable d'amplifier voire d'exprimer ses meilleurs ligands quand ces derniers ne sont pas formés naturellement au cours de l'équilibration.

III.2.4.4.3 *M:F non-équimolaire et concentration de ConA réduite*

Le deuxième paramètre modifié fut la concentration de ConA. En effet, dans les deux premiers tests, ConA se trouvait en excès par rapport à l'unité monomérique **M**. La réduction de la concentration de la lectine devait nous permettre de vérifier que les amplifications observées correspondaient bien aux meilleurs ligands de celle-ci. En effet, en diminuant la concentration de ConA, seuls ses ligands les plus affins seraient amplifiés.

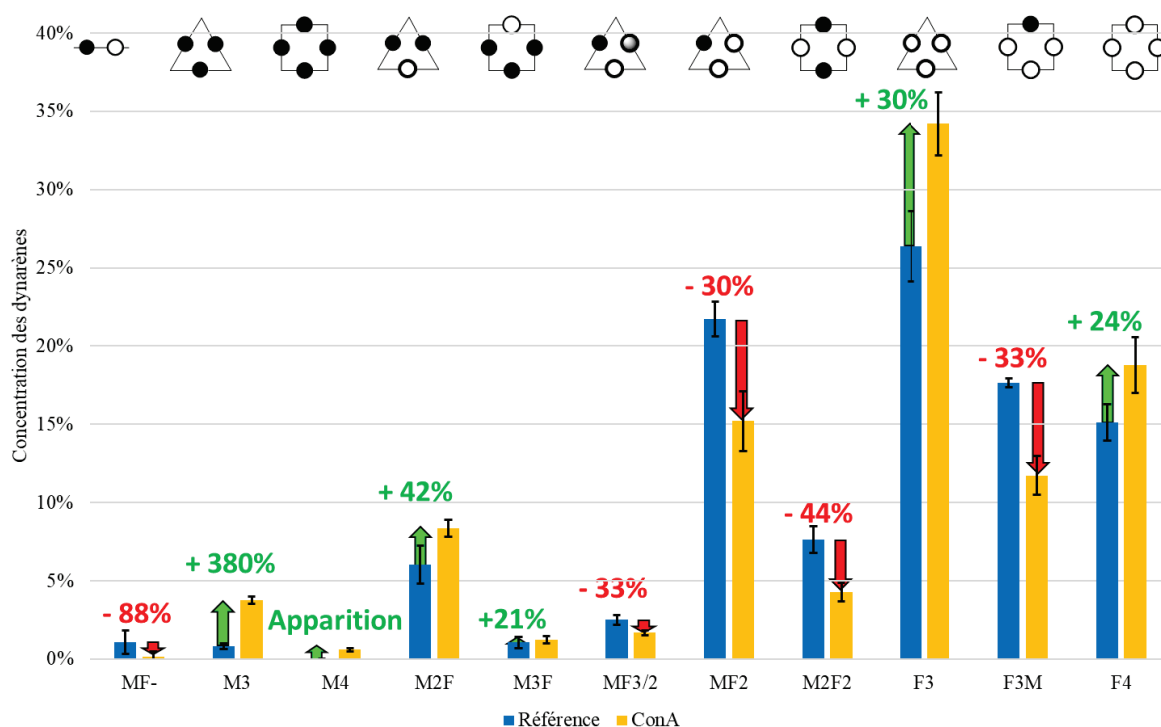


Figure 19 : Amplifications relatives des espèces formées entre une chimiothèque biaisée **M:F** (0.4 mM, 1:3) et **M:F** (0.4 mM, 1:3) + ConA. (0.1 mM). Analyse Grad-B, Col-A, Tampon-A, LC-A.

En analysant un triplicat d'expériences où la chimiothèque de référence était composée de **M:F** (0.4 mM, 1:3) et celle en présence de lectine de **M:F** (0.4 mM, 1:3) + ConA. (0.1 mM), les mêmes tendances que dans le cas où la lectine est en excès sont observées (Figure 19). Néanmoins, les amplifications des hétérodynarènes **M**₂**F** (181%→42%) et **M**₃**F** (101%→21%)

furent très fortement réduites par rapport à celles constatées lorsque ConA est en large excès. L'amplification de **M**₃ (423%→380%) n'est pas modifiée et l'apparition de **M**₄ a également lieu. Ceci tend à prouver que ces deux macrocycles sont les ligands les plus affins de ConA.

Grâce à ces diverses expérimentations où la valence de nos oligomères a été réduite par l'introduction d'une deuxième brique en équilibration (**F**), plusieurs conclusions peuvent être tirées.

- (1) Tout d'abord, l'introduction de ConA dans le système étudié modifie bien les proportions relatives des dynarènes et entraîne une redistribution des espèces. La présence de ConA amplifie les concentrations de certaines espèces riches en mannose et provoque même l'apparition du macrocycle **M**₄, non-observé dans les chimiothèques de référence statistiquement biaisées vers la formation des dynarènes fucosylés
- (2) La variation de concentration et de stoechiométrie de ConA et des ligands permet de s'assurer que tous les phénomènes d'amplification ont bien été détectés.
- (3) Les variations importantes des concentrations de tous les macrocycles démontrent l'absence de puits thermodynamique due à la trop grande stabilité d'une espèce par rapport aux autres. Toutefois, en observant la proportion des trimères et des tétramères, il est visible que les premiers sont favorisés entropiquement car ils composent la majorité des espèces en solution à l'équilibre (66%).
- (4) La variation importante de la distribution d'espèces à l'équilibre pour générer les homodynarènes **M**_n dans le cas d'une chimiothèque biaisée vers la formation des dynarènes fucosylés (chimiothèque **M** : **F** = 1:3) valide le fait que les macrocycles fortement mannosylés (**M**₃, **M**₄, **M**₂**F** et **M**₃**F**) possèdent les plus fortes affinités pour ConA.
- (5) La variation de la concentration de ConA (0.4 mM → 0.1 mM) modifie la distribution des espèces à l'équilibre. Les amplifications des homodynarènes de mannose restent stables tandis que celles des hétérooligomères diminuent fortement. Il est donc vraisemblable que les macrocycles **M**₃ et **M**₄ soient les meilleurs ligands de ConA.

Voulant prouver la forte affinité des homodynarènes **M**_n pour ConA, nous avons isolé les macrocycles en HPLC semi-préparative a été entreprise en vue de mesurer leur *K*_d en ITC.

III.2.5. Modification de la cinétique d'équilibration

Les travaux pour obtenir les dyn[n]arènes en HPLC semi-préparative se sont déroulés avec des nouveaux lots de briques moléculaires **M**, **F**, **G**, **Glc** et plusieurs mois après l'étude menée en présence de ConA. Un ralentissement significatif de la cinétique d'oligomérisation a été observé pour les nouvelles chimiothèques. Après plusieurs changements de lot de tampon tris/HCl et la vérification du pH pour les expérimentations, aucun changement significatif de la cinétique ne fut constaté. Le ralentissement de la cinétique étant très important (3 h→3 jours), l'influence de multiples paramètres fut investiguée. Une chimiothèque de référence **F** fut équilibrée dans le tampon-**A** et comparée à de multiples chimiothèques où seul un paramètre variait. Ainsi, des variations de pH (1, 4, 6.4, 7.4, 8.4, 10, 13), de tampon (acétate d'ammonium), de luminosité (sans lumière), de température (4°C, 37°C), d'agitation (absence),

de salinité (NaCl : 500 mM, 2M) de concentration (0.4 mM) furent investiguées et leurs influences sur l'oligomérisation déterminées. Un suivi cinétique fut effectué toutes les 24 h et l'atteinte de l'équilibre, caractérisée par la disparition du monomère, observée au bout de 72 h pour la chimiothèque de référence (Figure 20a). Plusieurs paramètres n'eurent qu'un impact faible voire inexistant sur la cinétique d'équilibration et la suroxydation.

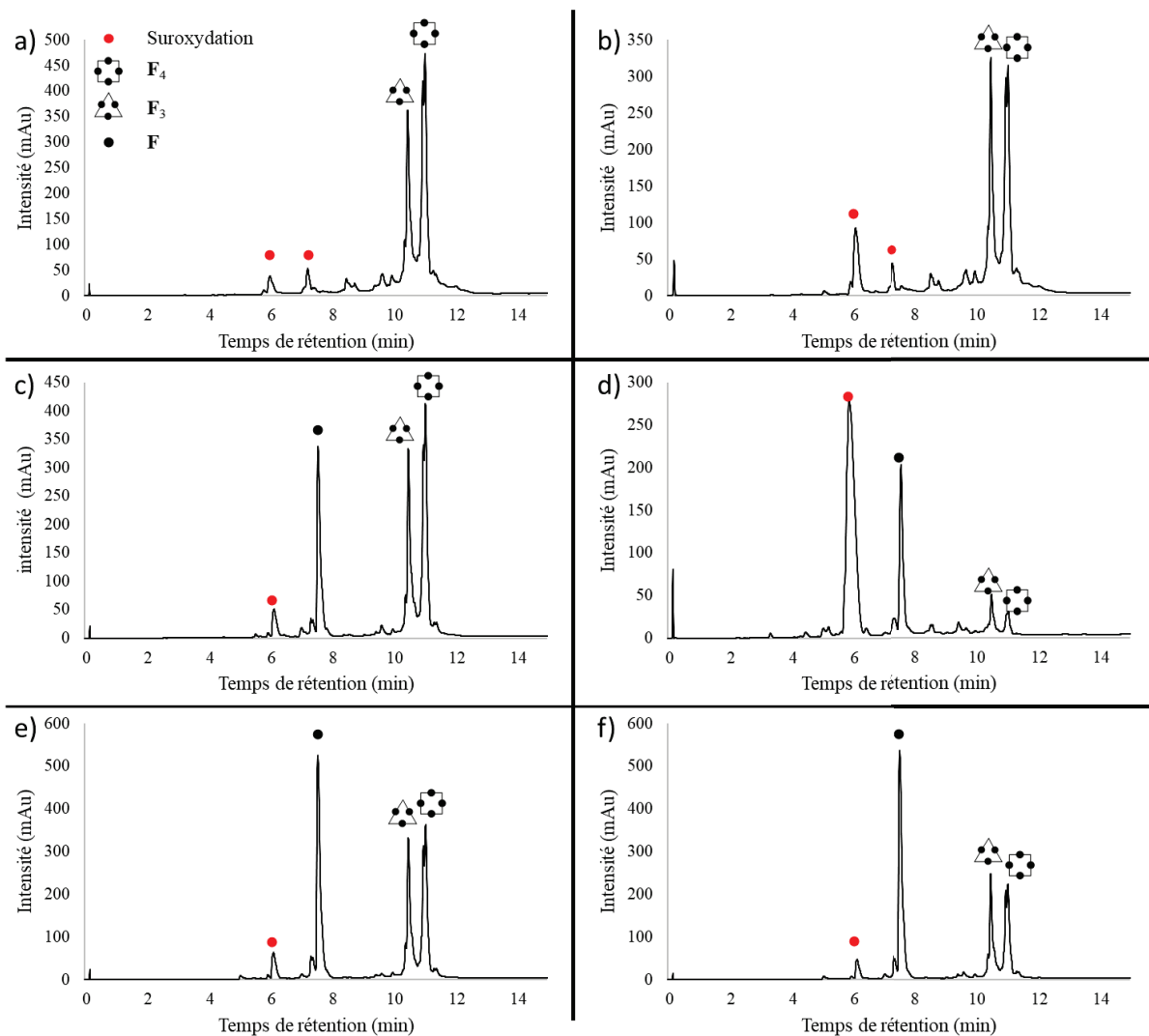


Figure 20 : Variations de divers paramètres pour l'étude en CCD de **F** à 4 mM. a) Référence, $t = 72$ h. b) $[F] = 0.4$ mM, $t = 24$ h. c) $pH = 1$, $t = 72$ h. d) $pH = 13$, $t = 24$ h. e) Absence de lumière, $t = 72$ h. f) $T = 4^{\circ}C$ + absence de lumière, $t = 72$ h. Analyses : Tampon-A, Grad-A, Col-A, LC-B

Parmi ces résultats non présentés ici sous forme de figure, une variation de pH faible (6.4, 8.4), la salinité (NaCl : 500 mM, 2M), l'agitation (absence), le tampon (acétate d'ammonium), ou une température physiologique ($37^{\circ}C$) ne modifièrent pas de manière drastique la cinétique d'équilibration et la distribution d'espèces. En revanche, une diminution par 10 de la concentration (0.4 mM) permit l'atteinte de l'équilibre au bout de seulement 24 h mais la suroxydation était plus importante (Figure 20b). Un pH très acide ($pH = 1$) ralentit la cinétique d'oligomérisation et le monomère fut encore observé à $t = 72$ h (Figure 20c). Toutefois, la continuation du suivi cinétique montra sa disparition après 96 h et permit l'obtention de la chimiothèque avec le moins d'espèces suroxydées. Une forte augmentation du pH (13) eut

l'effet inverse. Après 24 h, presque aucun dyn[n]arène n'était formé. La majeure partie du produit de départ était dégradé en une espèce suroxydée (Figure 20d). Finalement, les deux paramètres ayant le plus d'influence sur la cinétique d'oligomérisation furent la lumière et la température. Dans les deux cas, le monomère **F** était le composé majoritaire après 72 h d'équilibration (Figures 20e et 20f). Le suivi cinétique fut continué jusqu'à 9 jours mais le monomère de départ était toujours présent. La réaction à 4°C ayant été effectuée dans un frigo en absence de lumière, il était nécessaire de déterminer si la diminution de la température avait vraiment une influence sur la cinétique. En comparant les distributions d'espèces de la chimiothèque à 4°C et de celle en absence de lumière après 9 jours, l'intensité de **F** correspondait respectivement à 31% et 18% de l'intensité totale. Cette différence indique qu'un abaissement de la température ralentit bien la cinétique d'oligomérisation. Malgré une cinétique d'équilibration plus longue, dont la raison n'a pas encore été déterminée, les résultats obtenus sur l'influence des divers paramètres concordent avec les précédentes observations ou les chimiothèques s'équilibraient en 3 h.

Une autre question soulevée par cette étude concernait la proportion des divers dyn[n]arène à l'équilibre. Quel que soit le paramètre changé par rapport à la chimiothèque de référence, la composition à l'équilibre ne varia pas et resta à 50/50 entre le dyn[3]- et le dyn[4]arène.

III.2.6. Etude du comportement des briques monovalentes

III.2.6.1. Chimiothèque Y_M

Après avoir établi l'influence des divers paramètres physiques sur la cinétique d'oligomérisation et dans le but de réduire la valence des dyn[n]arènes formés, l'étude des briques monovalentes fut entreprise.

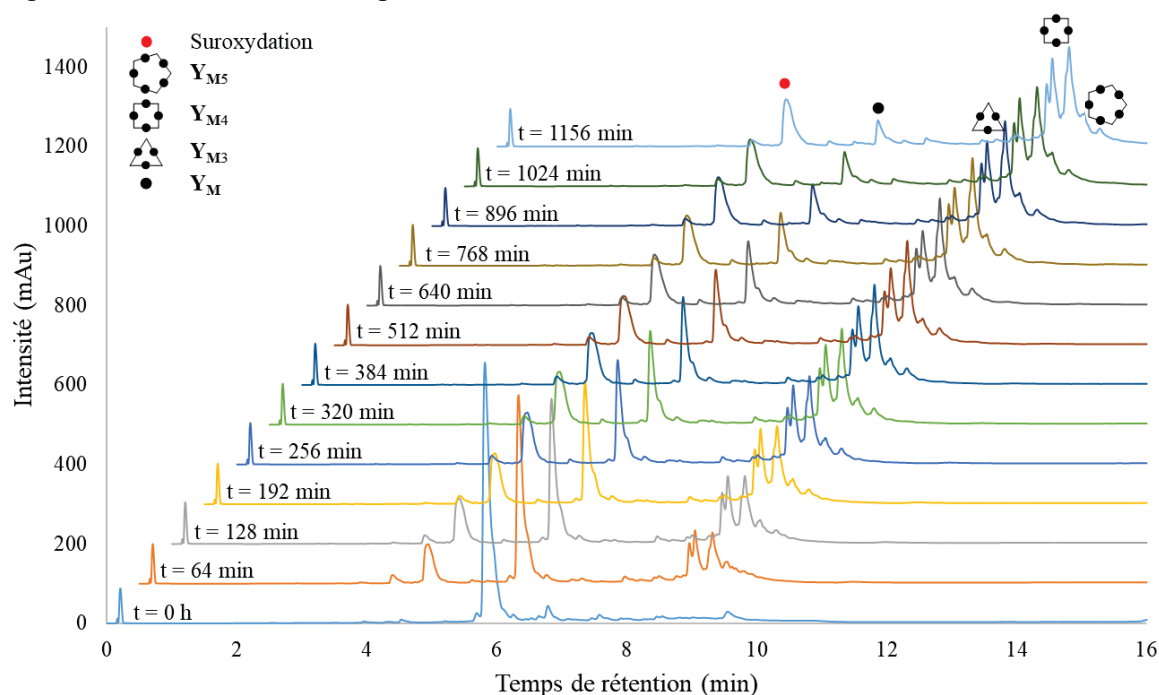


Figure 21 : Suivi cinétique de l'oligomérisation de Y_M à 0.4 mM. Analyses : Tampon-A, Grad-A, Col-A, LC-B

La première utilisée en CCD fut Y_M . Un suivi cinétique à 0.4 mM fut effectué pour vérifier si la vitesse d'oligomérisation avait lieu dans un temps raisonnable, compatible avec ConA. La cinétique se révéla proche de celle observée pour les briques divalentes avec une quasi disparition de l'espèce de départ après 20 h d'équilibration (Figure 21)

Une analyse par HPLC-MS effectuée sur une autre chimiothèque équilibrée à 4 mM permet d'identifier les divers dyn[n]arènes présents à l'équilibre (Figure 22). Les résultats obtenus étaient différents de ceux des briques divalentes. En effet, le dyn[3]arène est quasiment inexistant et la chimiothèque est dominée par les diastéréoisomères du dyn[4]arènes. La présence significative de Y_{M5} est observée et des traces de Y_{M6} ont été identifiées. L'accès à ces structures est très intéressant pour les futures chimiothèques en présence de ConA. En effet, la structure pentamérique est le pendant des pillar[5]arènes et l'hexamérique celle des calix[6]arènes.

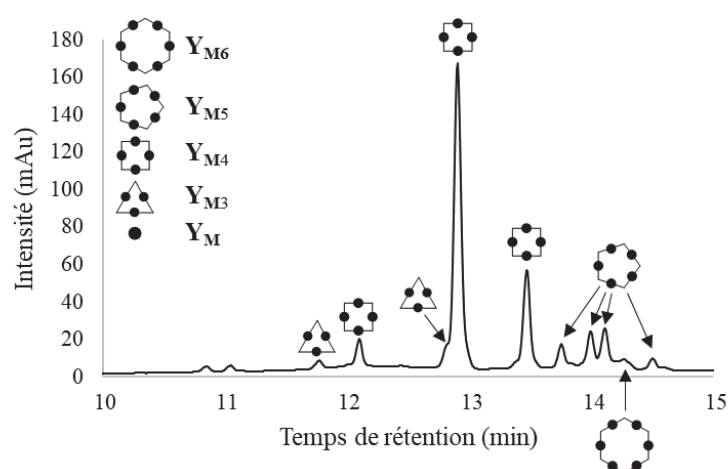


Figure 22 : Zoom sur les glyco-dyn[n]arènes issus de la chimiothèque Y_M à 4 mM. Analyses : Tampon-A, Grad-A, Col-B, LC-B

III.2.6.2. Chimiothèque Y_G

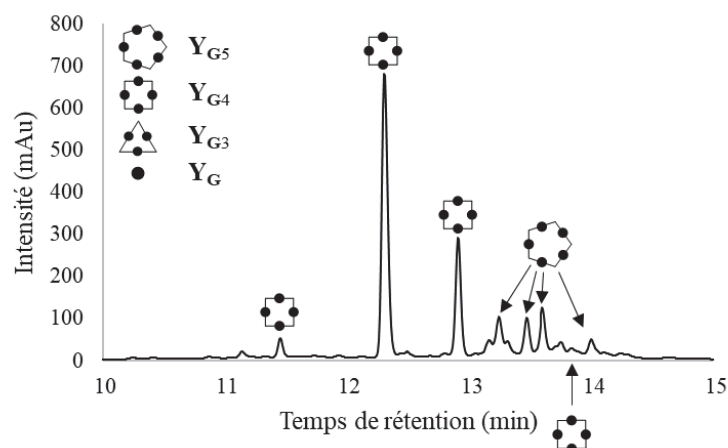


Figure 23 : Zoom sur les glyco-dyn[n]arènes issus de la chimiothèque Y_G à 4 mM Analyses : Tampon-A, Grad-A, Col-B, LC-B

La brique galactose Y_G fut aussi étudiée en CCD et les différentes espèces à l'équilibre furent attribuées par HPLC-MS (Figure 23). Comme pour Y_M , la chimiothèque est dominée par les diastéréoisomères du dyn[4]arène Y_{G4} . La présence significative de Y_{G5} est aussi relevée. Toutefois, aucun macrocycle de taille 3 ou 6 n'a été identifié.

III.2.7. Chimiothèque mixte brique mono- et divalente : $M:Y_M$

L'oligomérisation des briques monovalentes dans les conditions classiques d'équilibration étant maîtrisée, l'étape suivante consistait à mélanger les briques mono- et divalentes pour obtenir des structures jamais atteintes par voie synthétique classique. Une chimiothèque composée de $M:Y_M$ (4 mM, 1:1) fut équilibrée et analysée par HPLC-MS (Figure 24). La génération de nombreux hétérodynarènes fut relevée. Toutefois, la brique divalente M ne s'incorpora que peu dans les macrocycles de taille supérieure à 4 et les hétérodynarènes $M:Y_M$ obtenus furent principalement des dyn[3]- et dyn[4]arènes.

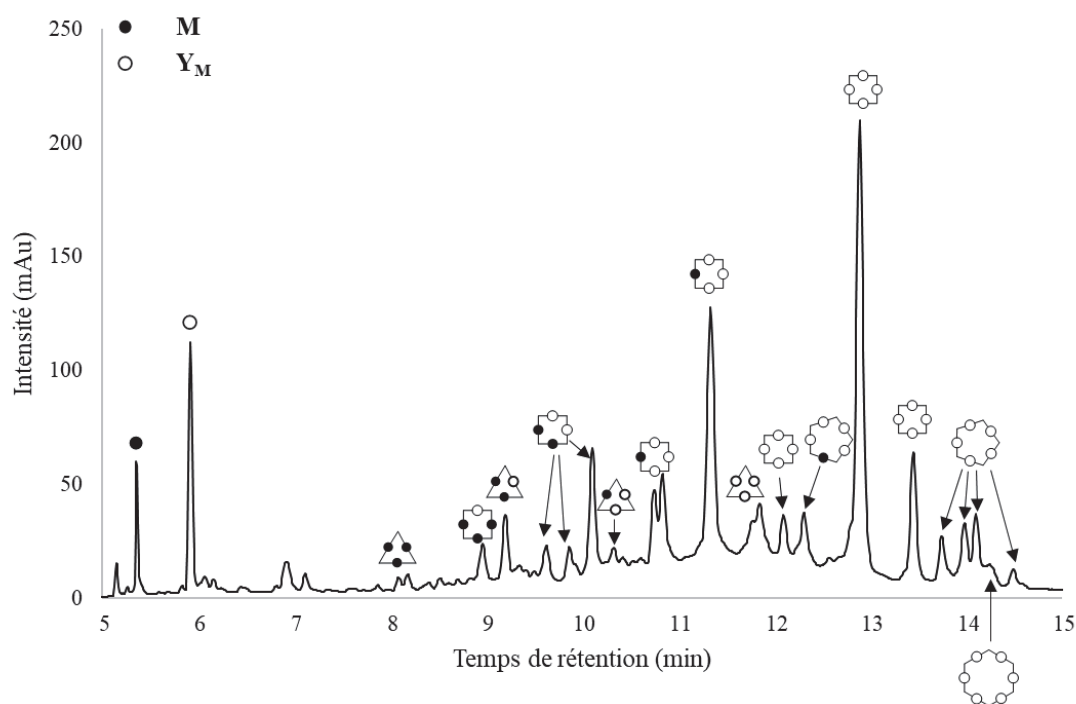


Figure 24 : Zoom sur les glycodyn[n]arènes issus de la chimiothèque $M:Y_M$ (4 mM, 1:1) Analyses : Tampon-A, Grad-A, Col-B, LC-B

Les chimiothèques issues de Y_M et $M:Y_M$ sont actuellement à l'étude et des tests en présence de ConA devraient être menés prochainement. Nous espérons découvrir des ligands affins ayant des structures intermédiaires entre les pillar[5]- et les pillar[10]arènes avec des valences comprises entre 6 et 9.

III.3. PURIFICATION PAR HPLC SEMI-PREPARATIVE

Dans le but d'obtenir des informations thermodynamiques sur nos dyn[n]arènes en présence des lectines, la purification des homodynarènes de chaque brique divalente a été menée par

HPLC-préparative. Une chimiothèque de **Glc** a été utilisée pour mettre au point la méthodologie. Un gradient (Grad-C) a été optimisé pour séparer les différents pics correspondant aux macrocycles, permettant ainsi d'isoler les dynarènes **Glc₃** et **Glc₄** séparément. L'équilibration de la brique monomérique **Glc** a eu lieu dans le tampon-A à 4 mM pendant 3 jours. Les fractions correspondant aux espèces **Glc₃** et **Glc₄** ont été collectées individuellement puis l'acétonitrile issu de la purification a été évaporé. L'eau restante a été lyophilisée puis la poudre blanche obtenue a été dissoute dans de l'eau distillée avant d'être placée dans des Eppendorfs et lyophilisée à nouveau. Une analyse par HPLC a été effectuée après le flaconnage en Eppendorf, révélant que le solide obtenu était composé d'un mélange 50/50 des homodynarènes **Glc₃** et **Glc₄**. Toutefois, il avait été vérifié durant la collecte que chaque pic isolé correspondait à un seul des homooligomères.

Une rééquilibration de ces derniers durant l'évaporation de l'acétonitrile et grâce à la présence en quantité non détectable par HPLC d'espèces linéaires a été supposée. Pour vérifier cette hypothèse, une deuxième chimiothèque combinatoire dynamique utilisant cette fois-ci la brique **G** a été équilibrée. Chaque tube de collecte a été prérempli avec 0.5 mL d'acide acétique pour acidifier la solution immédiatement en sortie de colonne et bloquer la réaction d'échange de ponts disulfures. Un suivi HPLC de fractions contenant majoritairement **G₃** ou **G₄** a été effectué (Figure 25). Même à pH 4, une réorganisation des homodynarènes est observée. L'acide acétique a été remplacé par le TFA (0.5 mL par tube) mais le même résultat a été obtenu.

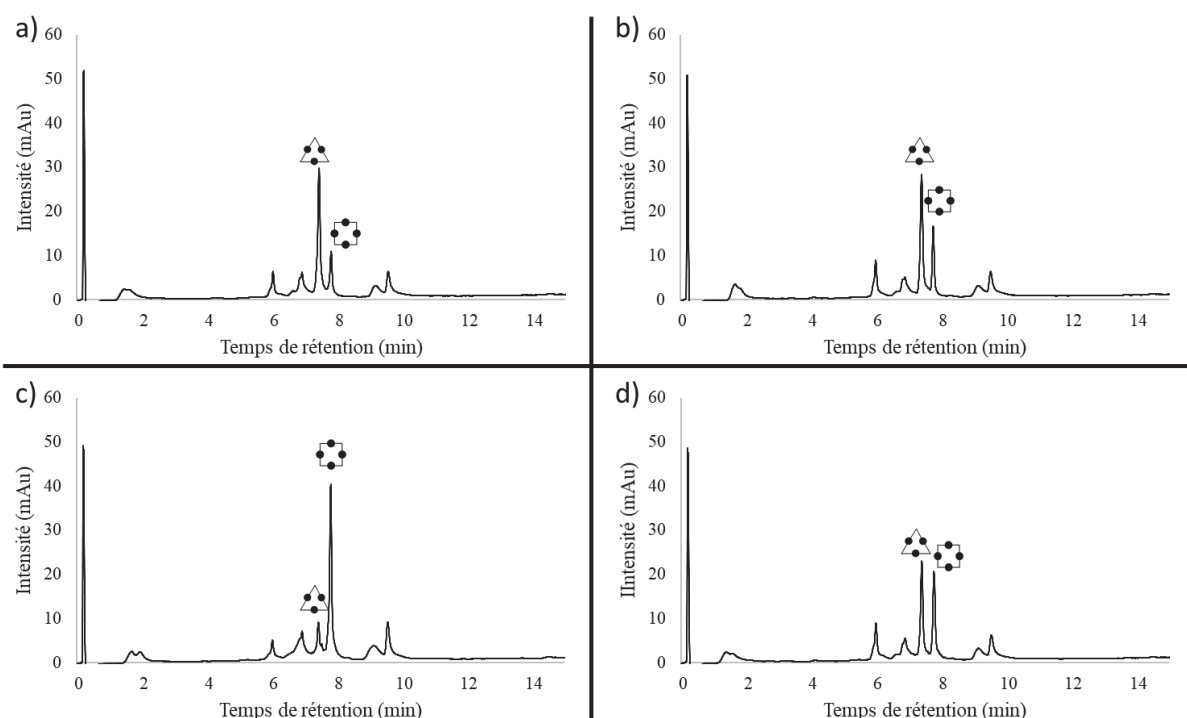


Figure 25 : Suivi cinétique de fractions purifiées en HPLC-préparative en présence d'AcOH a) **G₃** à t = 0. b) **G₃** à t = 24 h. c) **G₄** à t = 0. d) **G₄** à t = 24 h. Analyses : Tampon-A, Grad-A, Col-A, LC-B

Nous sommes donc capables de séparer par HPLC semi-préparative **G₃** de **G₄** mais les conditions opératoires ne permettent pas d'empêcher leur isomérisation. Le mélange **G₃:G₄** a donc été utilisé en ITC pour mesurer leurs affinités envers LecA.

Cette méthodologie a été appliquée aux dynarènes des briques monomériques **M**, **Glc** et **F**. Après équilibration à 4 mM, les mélanges de dyn[n]arènes (**M**₃:**M**₄), (**Glc**₃:**Glc**₄) et (**F**₃:**F**₄) ont été isolés selon divers gradient, analysés puis stockés à -20°C pour être utilisés en ITC.

III.4. TITRATION CALORIMETRIQUE ISOTHERME

III.4.1. Présentation succincte de la titration calorimétrique isotherme

L'ITC est une des techniques d'analyse les plus communes pour déterminer des affinités ligand-récepteur. C'est une des rares méthodes permettant de remonter à toutes les informations thermodynamiques (ΔG , ΔH , ΔS , K_d) d'un phénomène de reconnaissance ainsi qu'à la stœchiométrie n du complexe formé.²¹ De plus, toutes les espèces sont en solution et aucune modification (fixation, fluorescence) de la protéine ou du ligand n'est nécessaire pour l'expérimentation. Les seuls inconvénients de cette méthode d'analyse sont la consommation importante de protéine et la présence de phénomène d'agrégation lorsque les protéines sont mises en présence de ligands multivalents. La Figure 26 représente le fonctionnement classique d'un calorimètre et la manière dont sont déterminés les paramètres thermodynamiques à partir de la courbe de titration obtenue.

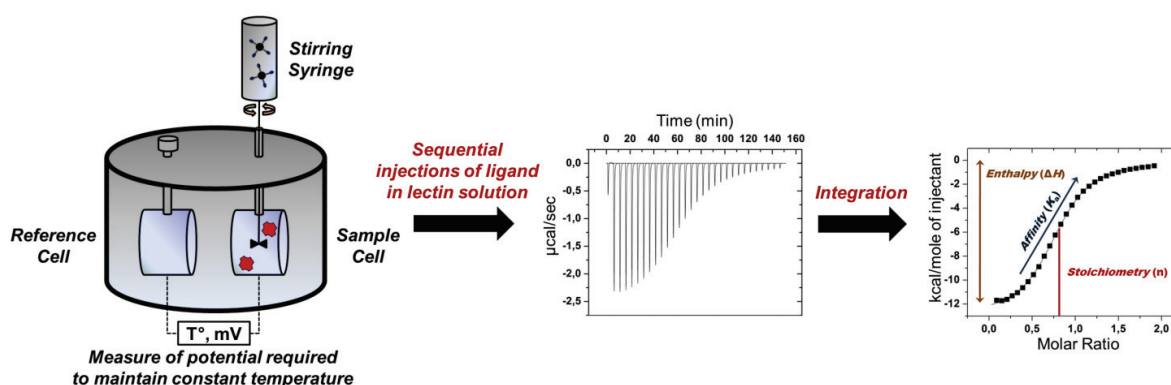


Figure 26 : (gauche) Représentation schématique du fonctionnement d'un calorimètre (milieu). Thermogramme obtenu à la suite de la titration. (droite) Courbe de titration et paramètres thermodynamiques déterminés à partir de celle-ci.²¹

III.4.2. Mesure des paramètres thermodynamiques des dyn[n]arènes **M**₃ et **M**₄ pour ConA

Les affinités de plusieurs molécules pour ConA ont été mesurées en ITC. Dans un premier temps et pour estimer la qualité de la lectine, un duplicat a été réalisé avec le α -D-mannopyranoside de méthyle (α -D-ManOMe) pour déterminer la stœchiométrie (Figure 27 haut gauche). Celle-ci fut mesurée à 0.67 (Tableau 1). Cette valeur étant assez éloignée de la valeur théorique ($n = 1$), les stœchiométries des autres molécules testées en ITC se verront appliquées un facteur correctif de $\frac{1}{0.67}$ pour obtenir des valeurs de stœchiométrie cohérentes. L'affinité du composé **II-80-Man** dérivant de l'acide téréphthalique fut mesurée (Figure 27 haut droite),

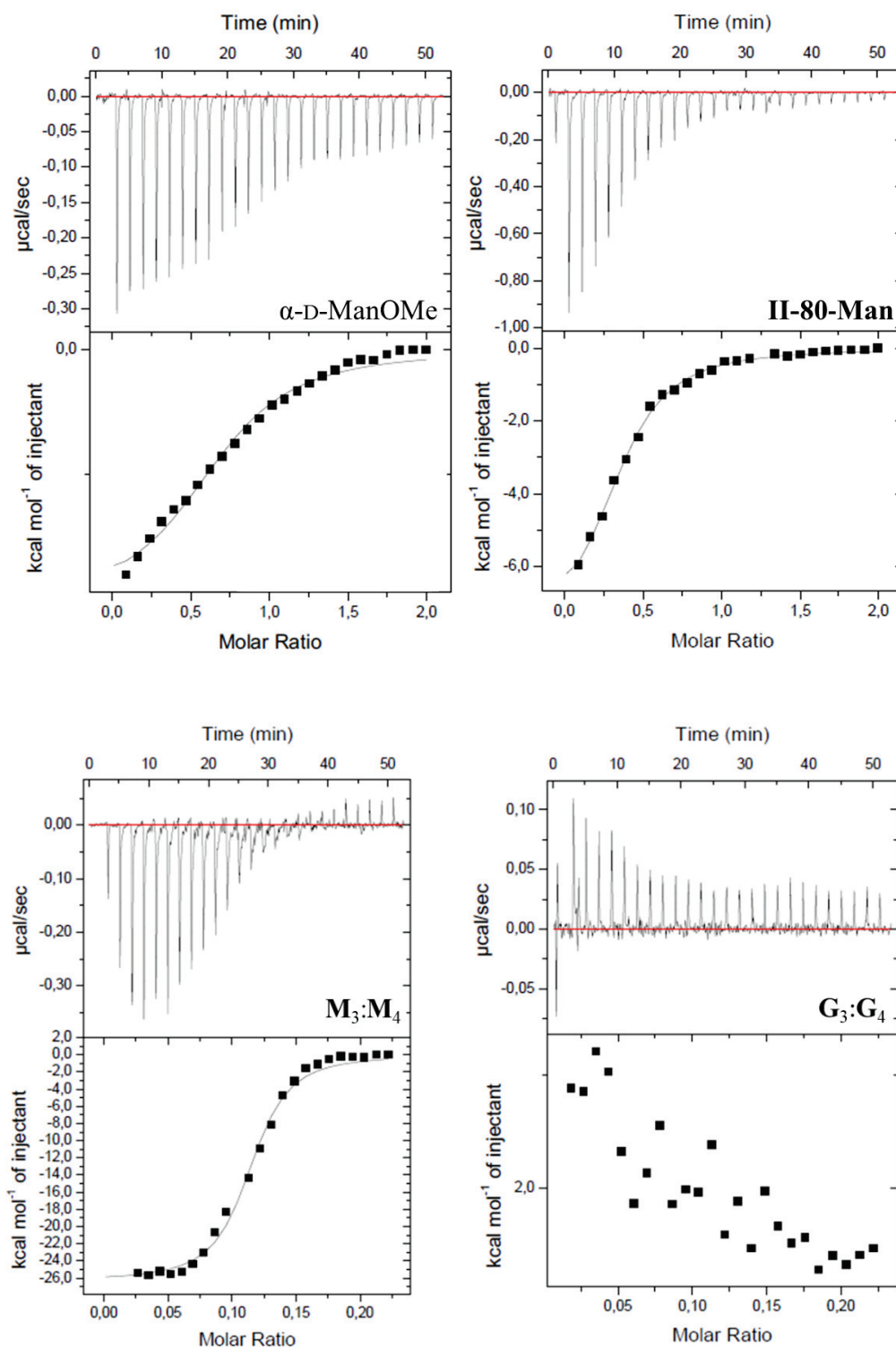


Figure 27 : Etude du phénomène d'association par ITC. (Haut gauche) Données ITC brutes pour ConA (0.12 mM) obtenues par injections du α -D-ManOMe (1.8 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site. (Haut droite) Données ITC brutes pour ConA (0.12 mM) obtenues par injections de II-80-Man (1.8 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site. (Bas gauche) Données ITC brutes pour ConA (0.12 mM) obtenues par injections d'un mélange $M_3:M_4$ (0.2 mM, 1:1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site. (Bas droite) Données ITC brutes pour ConA (0.12 mM) obtenues par injections d'un mélange $G_3:G_4$ (0.2 mM, 1:1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site.

révélant un K_d de 12 μM . Comparé à l' α -D-ManOMe, cela représente une très faible augmentation de l'affinité ($\beta = 1.5$). Toutefois, la stœchiométrie mesurée est bonne et un $n = 0.54$ est obtenu, très proche du $n = 0.50$ théorique attendu. Ainsi, le passage d'un composé monovalent à divalent a une incidence faible sur l'affinité. Le test suivant correspondait au mélange des homodyn[n]arènes **M**₃:**M**₄ (1:1) (Figure 27 bas gauche). Cette fois, les données obtenues montrent une forte amélioration de la constante de dissociation, celle-ci se trouvant dans le nanomolaire (300 nM) avec un facteur d'amélioration (β) de 60, largement supérieur aux saccharides portés par les glycodynarènes. Après application du facteur correctif, la stœchiométrie a été mesurée à 0.16 ce qui est cohérent avec une moyenne de 7 saccharides pour le mélange 1:1 des deux dyn[n]arènes. A la fin de l'expérimentation, il a aussi été observé la formation d'agrégats au sein de la cellule d'analyse. Ceci explique les difficultés à revenir à la ligne de base sur le thermogramme. La valeur du facteur d'amélioration β prouve la présence d'un effet multivalent entre les dyn[n]arènes de mannose et ConA. Enfin, un contrôle négatif a été réalisé avec un mélange composé de **G**₃:**G**₄ (1:1) (Figure 27 bas droite) pour vérifier l'absence d'affinité résiduelle provenant des bras espaceurs ou du noyau aromatique de nos dyn[n]arènes pour ConA. La courbe de titration obtenue correspond bien à une absence d'affinité entre la lectine et les homodynarènes **G**_n.

Tableau 1 : Mesures ITC de l'association de glycodynarènes mannosylés avec ConA

Ligand	n	$-\Delta H$ (kJ.mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kJ.mol ⁻¹)	K_d (μM)	β^a
α -D-ManOMe	1 ^b	8.53 $\pm$ 0.06	18.6 $\pm$ 0.4	18	1
II-80-Man	0.54 $\pm$ 0.03	36 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	12	1.5
M ₃ : M ₄ (1:1)	0.16 $\pm$ 0.01	37.3 $\pm$ 0.5	81 $\pm$ 6	0.30	60

^a Calculé comme le rapport de : K_d du composé monovalent sur K_d du composé multivalent, en utilisant le α -D-ManOMe comme référence monovalente. ^b Valeur fixée à 1 pour le traitement des données. Valeur expérimentale 0.67.

Les résultats obtenus par l'analyse en ITC d'un mélange **M**₃:**M**₄ viennent corrélérer ceux observés en CCD avec l'amplification par ConA de ces deux dynarènes au sein d'un mélange d'homodynarènes issus de l'équilibration d'une chimiothèque combinatoire dynamique composée des briques **M** et **F**. Ainsi, le système modèle développé en CCD avec ConA se trouve conforté par la mesure des affinités des espèces les plus amplifiées. Ce modèle est actuellement en train d'être étendu à d'autres lectines et notamment celles de *Pseudomonas aeruginosa* (LecA et LecB).

III.4.3. Mesure des paramètres thermodynamiques des dyn[n]arènes **G**₃ et **G**₄ pour LecA

Après avoir déterminé les affinités des dyn[n]arènes mannosylés pour ConA et valider le système modèle développé en CCD, nous avons entrepris de mesurer les affinités des homodyn[n]arènes **G**_n pour LecA. Comme pour ConA, l'objectif était de corrélérer les affinités obtenues avec la CCD, une fois cette dernière effectuée en présence de LecA. Seuls deux composés ont pu être testés en ITC : le β -D-galactopyrannoside de méthyle (β -D-GalOMe) (Figure 28 gauche) et le mélange **G**₃:**G**₄(1:1) (Figure 28 droite). La constante de dissociation

du β -D-GalOMe a été déterminée à 24 μ M et une stœchiométrie $n = 0.60$ a été observée (Tableau 2). Comme dans le cas de ConA, un facteur correctif $\frac{1}{0.60}$ a été appliqué aux stœchiométries des autres composés. Le mélange $G_3:G_4$ (1:1) versus LecA a ensuite été dupliqué en ITC. La constante de dissociation obtenue était inférieure à la centaine de nanomolaire (89 nM) ce qui fait du mélange $G_3:G_4$ des ligands aussi affins que le calix[4]arène 1,3-alterné ($K_d = 174$ nM) précédemment développé au laboratoire.³⁵ Le facteur d'amplification $\beta = 270$ est largement supérieur au nombre de saccharides des dyn[n]arènes et ceci corrèle avec un effet multivalent. Comme pour ConA, des agrégats dans la cellule sont observés à la fin de l'expérimentation. Seule la valeur de la stœchiométrie (0.10) est faible par rapport au nombre de saccharides présents sur les dynarènes. Une valeur plus proche des 0.15 était attendue. D'autres mesures ITC en triplicat seront nécessaires pour valider ces premiers résultats.

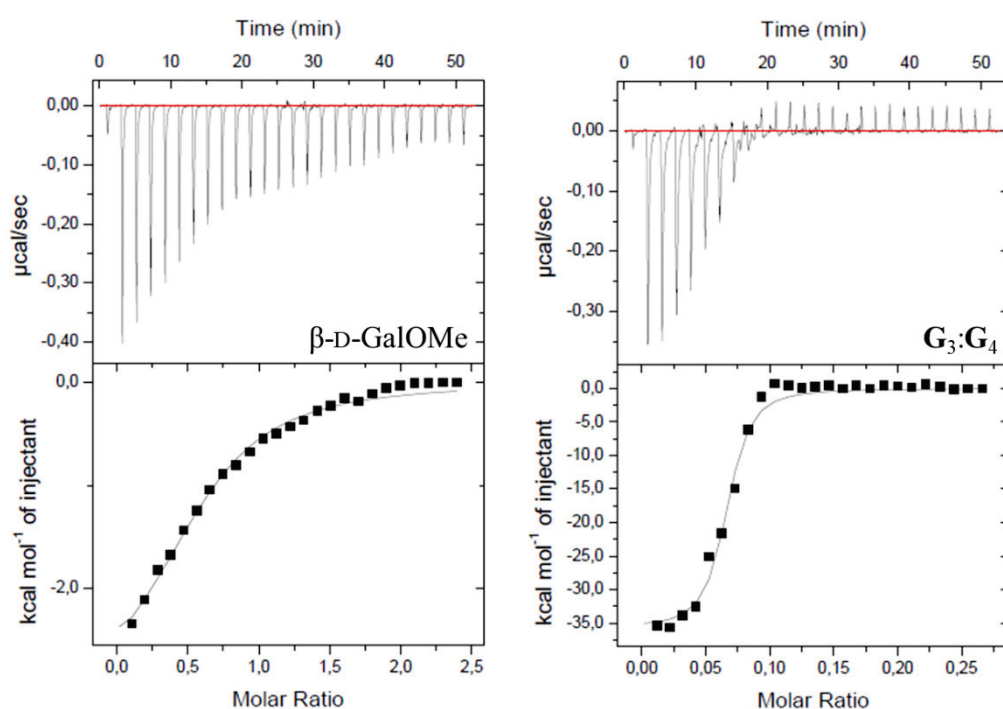


Figure 28 : Etude du phénomène d'association par ITC. (Gauche) Données ITC brutes pour LecA (0.1 mM) obtenues par injections du β -D-GalOMe (1.8 mM) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site. (Droite) Données ITC brutes pour LecA (0.1 mM) obtenues par injections de $[G_3] + [G_4]$ (0.2 mM, 1:1) et la courbe d'intégration obtenue avec un modèle d'association à 1 site.

Tableau 2 : Mesures ITC de l'association de glycodynarènes galactosylés avec LecA

Ligand	n	$-\Delta H$ (kJ.mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kJ.mol ⁻¹)	K_d (μ M)	β^a
β -D-GalOMe	1 ^b	16 ± 2	11 ± 2	24	1
$G_3:G_4$ (1:1)	0.104 ± 0.001	148 ± 2	107 ± 4	0.089	270
Calix[4]arène 1,3-alterné	0.24 ± 0.01	104 ± 1	65 ± 1	0.176	136

^a Calculé comme le rapport de : K_d du composé monovalent sur K_d du composé multivalent, en utilisant le β -D-GalOMe comme référence monovalente. ^b Valeur fixée à 1 pour le traitement des données. Valeur expérimentale 0.67.

Les mesures effectuées en ITC avec un mélange d'homodynarènes $G_3:G_4$ et LecA montrent encore une fois la prédominance d'un effet multivalent avec la lectine. La formation d'agrégats étant observée dans la cellule d'analyse, il serait intéressant de vérifier si, comme pour le calix[4]arène 1,3-alterné, un effet de chélate agrégatif n'est pas la source de la forte affinité de dyn[n]arènes galactosylés. Il reste à étudier le comportement de LecA en CCD avec les différentes briques galactosylés synthétisées et déterminer si les fortes affinités mesurées en ITC pour les homodyn[n]arènes G_n corrélaient avec les espèces amplifiées en CCD.

III.5. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons abordé l'étude par CCD des briques *p*-dithiophénols mono- et divalentes préalablement synthétisées. Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions opératoires de nos chimiothèques combinatoires dynamiques. Nous avons vu que des réactions parasites (1) la suroxydation des thiols en acides sulféniques et sulfiniques et (2) une cyclisation intramoléculaire S-N entre le thiol et l'amide en *ortho*, enlevaient des espèces de l'équilibration. Une première optimisation a permis de montrer que cette suroxydation pouvait être limitée par l'abaissement de la température (4°C). En contrepartie, un temps plus long (3 h → 3 jours) était nécessaire à l'atteinte de l'équilibre.

Les espèces issues des différentes chimiothèques combinatoires dynamiques provenant de l'équilibration des briques moléculaires divalentes (**M**, **F**, **G**, **Glc**) ont été identifiées par HPLC-MS. L'analyse a montré la formation exclusive des dyn[3]- et dyn[4]arènes. Un système modèle pour travailler en présence de lectine a été développé avec ConA. Une première chimiothèque en présence de **M** et ConA a montré que la lectine n'était pas capable d'amplifier sélectivement un macrocycle par rapport à l'autre. Les dyn[n]arènes mannosylés étant hexa- ou octavalents, il a été supposé que la différence d'affinité de ces derniers pour la lectine était trop faible pour obtenir une amplification détectable par HPLC.

Une réduction de la valence des oligomères a été envisagée pour pouvoir observer des phénomènes d'amplification. Deux possibilités ont été investiguées : (1) Diminuer la valence des briques monomériques via la synthèse de composés monovalents ou (2) créer des chimiothèques combinatoires dynamiques mixtes avec deux briques moléculaires, l'une possédant un épitope et l'autre non-reconnue par la lectine. Des chimiothèques mixtes entre **M** (épitope de ConA) et divers dithiophénols (**A**, **P**, **F**) ont été générées. Seule la combinaison de **M** et **F** a donné des résultats probants avec une distribution à l'équilibre de tous les homo- et hétérodyn[3,4]arènes. Une première expérience en présence de ConA a montré la dissociation des hétérodynarènes pour restaurer les homodynarènes, ligands plus affins. L'influence de la concentration en lectine et en saccharide a été étudiée et les résultats concordent pour identifier les homodyn[n]arènes **M**₃ et **M**₄ comme les meilleurs ligands de ConA. Pour vérifier cette observation, l'isolement des composés par HPLC semi-préparative a été entrepris. Malencontreusement, une modification des espèces isolées après séparation, pour redonner un mélange 1:1 entre le dyn[3]- et le dyn[4]arène, est observée. L'acidification en sortie de colonne des macrocycles n'a pas permis d'éviter ce phénomène. Ainsi, les études d'affinité des homodynarènes pour les lectines ont été réalisées à partir d'un mélange 1:1 entre le dyn[3]- et le dyn[4]arène. L'affinité mesurée entre ConA et le mélange **M**₃:**M**₄ a montré la présence d'un effet multivalent avec un facteur d'amplification $\beta = 60$ supérieur au nombre de saccharides

portés par **M**₃ et **M**₄. Ces résultats corrélerent avec les observations faites en CCD où les homodyn[n]arènes **M**₃ et **M**₄ possédaient les plus grandes affinités pour ConA. Ces résultats valident le système modèle établi en CCD avec ConA et son application aux lectines de *Pseudomonas aeruginosa* est en cours.

La deuxième voie pour diminuer la valence de nos oligomères a nécessité la synthèse de briques monovalentes (**Y**_M, **Y**_G, **Y**_F, **Y**_{GLC}). L'étude du comportement de **Y**_M et **Y**_G en CCD a été réalisée. Contrairement aux briques divalentes, les espèces majoritaires à l'équilibre sont les dyn[n]arènes tétra- et pentamériques. Des traces de dyn[3]- et dyn[6]arènes sont aussi observées. Un mélange entre les briques mannosylées mono- (**Y**_M) et divalentes (**M**) a montré la formation d'hétérodyn[n]arènes possédant des valences variant entre 3 et 6. Ces diverses chimiothèques (mixte ou non) seront testées prochainement avec notre système modèle pour vérifier que ConA est capable d'influencer la distribution d'espèces et d'amplifier ses meilleurs ligands.

Experimental section

IV. EXPERIMENTAL SECTION

IV.1. General information

IV.1.1. Reagents and solvents

Commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich, ThermoFisher Scientific, TCI chemicals, Fluorochem or Carbosynth. The solvents were purchased from ThermoFisher Scientific and VWR. Dry solvents (CH_2Cl_2 , THF) were obtained from a PureSolv solvent purification system from Innovative technology. Water for HPLC was obtained from an ACCU 20 Ultra Pure Water from Fisher Scientific. Analytical Thin Layer Chromatography (TLC) was carried on Macherey-Nagel silica gel 60 F254 and revealed with a UV lamp at 254 nm. Flash silica gel column chromatography was conducted with a Macherey-Nagel silica 60 M (0.04-0.063 mm).

IV.1.2. Nuclear Magnetic Resonance

^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC experiments were performed on Bruker spectrometers: AV 300, AVL 300, AV 400 and AV 500 at 298K in the CCRMN of the University of Lyon and spectrometer Varian Inova 600 MHz with HCN cryoprobe in the ISA of the University of Lyon. The chemical shifts are indicated in ppm (parts per million) in reference to the TMS. Coupling constants (J) are indicated in Hz (Hertz). The abbreviations used for the multiplicity are: s (singlet), b (broad), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), td (triplet of doublet), q (quadruplet), m (multiplet).

IV.1.3. Mass Spectrometry

Low resolution mass spectrometry was performed on a LCQ advantage (50-20 000 m/z) apparatus from Thermofinnigan. High resolution mass spectrometry was performed on a MicrOTOFQ II (50-20 000 m/z) apparatus from Bruker. Electrospray ionization was used in all cases.

IV.1.4. High Performance Liquid Chromatography

Analyses were performed on various HPLC systems and columns (See below). The chromatographic separation was performed at 30°C. The chromatograms were recorded at 210 and 250 nm.

IV.1.5. HPLC system

IV.1.5.1. HPLC

LC-A: HPLC Agilent 1260 Infinity system equipped with a quaternary pump, an auto-sampler, a diode array detector

LC-B: UPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system equipped with a binary pump, an auto-sampler, a variable wavelength UV detector (Maximum 4).

LC-C: semi-preparative HPLC Shimadzu prominence 20A system equipped with a binary pump, a manual injection manifold, a variable wavelength UV detector (Maximum 2).

IV.1.5.2. Columns

Column A (Col-A) : Agilent EC 120 Poroshell C8 120 Å, 2.1×50 mm, 2.7 µm.

Column B (Col-B) : Thermo Scientific Accucore C8 80 Å, 2.1×50 mm, 2.6 µm

Column C (Col-C) : Agilent PLRP-S 300 Å, 25×150 mm, 8 µm.

IV.1.5.3. Buffers

Buffer A (Tampon-A): Buffer tris/HCl 200 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, CaCl₂ 100 µM.

Buffer B (Tampon-B): Buffer phosphate 200 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, MnCl₂ 100 µM

Buffer C (Tampon-C): Buffer ammonium acetate 200 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, CaCl₂ 100 µM.

Buffer D (Tampon-D): Buffer tris/HCl 200 mM, pH 7.4, NaCl 500 mM, CaCl₂ 100 µM.

Buffer E (Tampon-E): Buffer tris/HCl 200 mM, pH 7.4, NaCl 2M, CaCl₂ 100 µM.

IV.1.5.4. Gradients

Table 1 : Gradient A (Grad-A)

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeCN + 0.1% FA
0.0	0.800	100%	0%
15.0	0.800	70%	30%
20.0	0.800	0%	100%
22.0	0.800	0%	100%
22.5	0.800	100%	0%
30.0	0.800	100%	0%

Tableau 2 : Gradient B (Grad-B)

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeCN + 0.1% FA
0.0	0.800	88%	12%
15.0	0.800	80%	20%
20.0	0.800	0%	100%
22.0	0.800	0%	100%
22.5	0.800	100%	0%
30.0	0.800	100%	0%

Tableau 3 : Gradient C (Grad-C)

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeCN + 0.1% FA
0.0	20	85%	15%
15.0	20	82%	18%
20.0	20	0%	100%
22.0	20	0%	100%
22.5	20	100%	0%
30.0	20	100%	0%

Tableau 4 : Gradient D (Grad-D)

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeCN + 0.1% FA
0.0	20	85%	15%
15.0	20	78%	22%
20.0	20	0%	100%
22.0	20	0%	100%
22.5	20	100%	0%
30.0	20	100%	0%

IV.1.6. HPLC-MS

Analyses were performed on a Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system equipped with a binary pump, an auto-sampler, a variable wavelength UV detector. The chromatographic separation was performed at 30°C on various columns. The chromatograms were recorded at 210 and 250 nm. High resolution mass spectrometry was performed on a QTOF Impact II (50-20 000 *m/z*) apparatus from Bruker.

IV.1.7. Melting point

Melting points were determined with a Büchi Melting B-540.

IV.1.8. Lyophilization

Lyophilization was carried out in a CHRIST Alpha 2-4 LDPlus

IV.1.9. C18 Chromatography

C18 Chromatography was performed on a CombiFlash Companion system from Serlabo Technologies with a 4g Grace C18 Reversed-Phase column.

IV.2. Synthesis

IV.2.1. General procedures

General procedure A for the formation of amides with HOBt/EDCI

Diacid (1 eq.), HOBt•H₂O (2.6 eq.) and EDCI•HCl or EDCI (2.6 eq.) were suspended under inert atmosphere (Ar) in dry CH₂Cl₂ (10 mL for 100 mg of diacid) affording a yellow

suspension. *i*Pr₂NEt (5.2 eq.) was then added and the mixture was stirred at r.t. during 30 min. The solution turned from yellow to orange and from suspension to homogeneous. Amine (2.6 eq.) dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise and the stirring was continued during 18 h at r.t. The solvent was evaporated off and the crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 97:3) to afford the desired diamide.

General procedure B for deprotection of 2-cyanoethyl and acetyl groups

Starting material (1 eq.) and CsOH•H₂O (4 eq. + 4 eq. per saccharide + 4 eq. per 2-cyanoethyl) were dissolved in degassed THF/MeOH (1:1 v/v, 10 mL for 100 mg of starting material) under inert atmosphere (Ar). The mixture was stirred at r.t. during 3 h then 2M HCl was carefully added to reach pH 4. The solvent was evaporated off. The residue was purified by C18 silica gel column chromatography (Gradient: 4 CV 100% H₂O + 0.1% TFA, 10 CV 100% MeOH + 0.1% TFA, 4 CV 100% MeOH + 0.1% TFA, 4 CV 100% H₂O + 0.1% TFA). Methanol and TFA were removed via a rotary evaporator and the water left was removed using a freeze-dryer affording the desired product.

General procedure C for the azide-alkyne “click” conjugation

Pyromellitic diimide (1 eq.), azide (2.5 eq.) and copper iodide (0.25 eq.) were suspended in dry DMF (10 mL for 200 mg of pyromellitic diimide) affording a heterogeneous yellow solution. *i*Pr₂NEt (2.5 eq.) was then added under inert atmosphere and the mixture was stirred at r.t. The reaction was monitored by TLC until completion. The solvent was evaporated off and the crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (EtOAc to EtOAc/MeOH 95:5) to afford the desired compound.

General procedure D for the formation of Boc-protected amines

Azide (1 eq.) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (20 mL for 500 mg of azide) and placed in an autoclave. Boc₂O (2 eq.) then Pd/C 10% (100 mg for 500 mg of azide) were added. The autoclave was sealed and placed under H₂ atmosphere (6 bar). The mixture was stirred at r.t. during 14 h. The heterogeneous mixture was filtered on a pad of celite and washed with CH₂Cl₂ (200 mL). The filtrate was evaporated and the oily residue was purified by flash silica gel column chromatography (EtOAc/cyclohexane 75:25) to afford the desired Boc-amine and excess <10% of TFA as evidenced by ¹³C NMR.

General procedure E for the deprotection of Boc-amine

Boc-amine (1 eq.) was dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry CH₂Cl₂/TFA (7.5 mL, 2:1 v/v for 500 mg of Boc-amine) and TFA (2.5 mL). The reaction was monitored by TLC. Solvent was evaporated and co-evaporated with MeOH (3×10 mL) to afford the desired TFA salt amine.

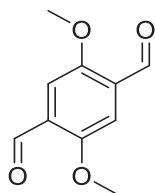
General procedure F for the reduction of azides into amines

Azide (1 eq.) was dissolved in an autoclave in dry CH₂Cl₂ (20 mL for 500 mg of azide) then Pd/C 10% (100 mg) was added. The autoclave was sealed and placed under H₂ atmosphere (6 bar). The mixture was stirred at r.t. during 14 h. The heterogeneous mixture was filtered on a pad of celite and washed with CH₂Cl₂ (200 mL). Solvent was evaporated off to afford a mixture of the *N*-acetyl compound and the desired amine.

General procedure G for the formation of amides with HCTU

Acid (1 eq.) and HCTU (1 eq. per acid) were dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry CH₂Cl₂ (10 mL for 100 mg of acid). *i*Pr₂NEt (1 eq. per acid) was added and the mixture was stirred during 30 min. Ammonium (1 eq. per acid) dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was added to the reaction affording a suspension. *i*Pr₂NEt (4 eq. per acid) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL) and added through a syringe pump over 16 h. The solvent was evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 96.5:3.5). The purified fraction was dissolved in EtOAc (30 mL) and washed with water (10×15 mL) to remove tetramethyl urea (TMU). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated to afford the desired product.

IV.2.2. Protocols

2,5-Dimethoxyterephthalaldehyde II-58**II-58**

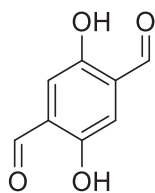
1,4-Dimethoxybenzene (5 g, 36.2 mmol) was dissolved in dry Et₂O (120 mL) and placed under inert atmosphere (N₂). TMEDA (16.3 mL, 108.6 mmol, 3 eq.) was added and the mixture was cooled to 0°C in an ice bath. *n*-BuLi (2.5M in hexane, 43.44 mL, 108.6 mmol, 3 eq.) was added dropwise. Then, the reaction mixture was heated at reflux during 16 h. The solution was cooled to 0°C and DMF (8.42 mL, 108.6 mmol, 3 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred at r.t. during 1 h. The solution was quenched with water (120 mL) and 3M HCl (25 mL). The aqueous layer was extracted with chloroform (3×100 mL). Organic layers were combined, dried (Na₂SO₄) and evaporated. The product was recrystallized in chloroform giving 2,5-dimethoxyterephthalaldehyde **II-58** as a yellow solid (3.91 g, 55%):

$R_f = 0.70$ (CHCl₃)

$mp = 207^\circ\text{C}$

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 10.49 (s, 2H, CHO), 7.45 (s, 2H, H_{Ar}), 3.94 (s, 6H, CH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.¹⁸²

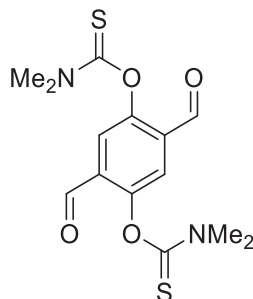
2,5-Dihydroxyterephthalaldehyde II-59**II-59**

2,5-Dimethoxyterephthalaldehyde **II-58** (2 g, 10.3 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (48 mL) under inert atmosphere (N₂). A solution of BBr₃ (1M in CH₂Cl₂, 41.2 mL, 41.2 mmol, 4 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred during 5 h at r.t. Then, the solution was cooled to 0°C with an ice bath and water (88 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at r.t. overnight. A solution of Rochelle salts (150 mL) was added and the aqueous layer was extracted with warm chloroform (50°C). The organic layer was dried (Na₂SO₄) and evaporated. A recrystallization in chloroform/hexane (3:1 v/v) was performed. The precipitate was filtered, washed with hexane and dried under vacuum yielding 2,5-dihydroxyterephthalaldehyde **II-59** (1.23 g, 71%) as an orange amorphous solid.

R_f = 0.50 (Hexane/EtOAc 70:30)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 10.23 (s, 2H, CHO), 9.96 (s, 2H, OH), 7.24 (s, 2H, H_{AR}).

¹H NMR data was in agreement with the literature.¹⁸³

2,5-Di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalaldehyde II-60**II-60**

2,5-Dihydroxyterephthalaldehyde **II-59** (1.23 g, 7.4 mmol) and DABCO (3.32 g, 29.6 mmol, 4 eq.) were dissolved in dry DMA (33 mL) under inert atmosphere (N₂). The mixture was cooled to 0°C using an ice bath. *N,N*-Dimethylthiocarbamoyl chloride (3.65 g, 29.6 mmol, 4 eq.) dissolved in dry DMA (10 mL) was added dropwise. The ice bath was removed and the mixture was stirred at r.t. during 16 h. The solid was filtered, washed with water (3×50 mL) and dried under vacuum, yielding 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalaldehyde **II-60** (2.13 g, 85%) as a white amorphous solid.

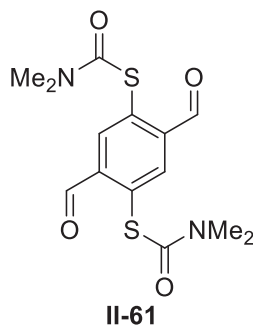
R_f = 0.20 (Hexane/EtOAc 70:30)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 10.06 (s, 2H, CHO), 7.66 (s, 2H, H_{AR}), 3.48; 3.44 (2s, 2×6H, NMe₂).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 187.3 (s, 2C, CHO), 185.5 (s, 2C, COS), 151.8 (s, 2C, C_{Ar}O), 133.1 (s, 2C, C_{Ar}CHO), 123.9 (s, 2C, CH_{Ar}), 42.9; 38.5 (2s, 4C, NMe₂).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₁₄H₁₇N₂O₄S₂ : [M+H]⁺ = 341.0624, found 341.0623.

2,5-Di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalaldehyde **II-61**



In a 30-mL microwave vial, 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalaldehyde **II-60** (400 mg, 1.18 mmol) was suspended in degassed dry NMP (10 mL). The rearrangement was performed under microwave activation at 210°C during 9 min. The vial was cooled in the fridge (4°C) and the resulting precipitate was filtered off, giving 2,5-di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalaldehyde **II-61** (220 mg, 55%) as salmon colour needles.

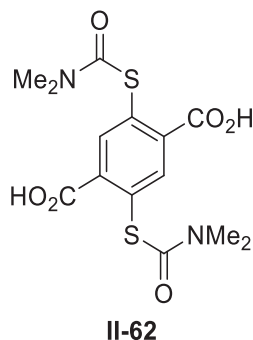
R_f = 0.10 (Hexane/EtOAc 70:30)

^1H NMR (300 MHz, CDCl₃): 10.25 (s, 2H, CHO), 8.18 (s, 2H, H_{Ar}), 3.18 (s, 6H, NMe₂), 3.03 (s, 2H, NMe₂).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 189.4 (s, 2C, CHO), 162.9 (s, 2C, COS), 139.9 (s, 2C, C_{Ar}CHO), 136.0 (s, 2C, CH_{Ar}), 133.5 (s, 2C, C_{Ar}S), 36.5 (s, 4C, NMe₂).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₁₄H₁₇N₂O₄S₂ : [M+H]⁺ = 341.0624, found 341.0625.

2,5-Di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalic acid **II-62**



2,5-Di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalaldehyde **II-61** (470 mg, 1.38 mmol) was dissolved in a mixture of dioxane/water (22 mL, 5:3 v/v). KMnO₄ (1.74 g, 11.04 mmol, 8 eq.)

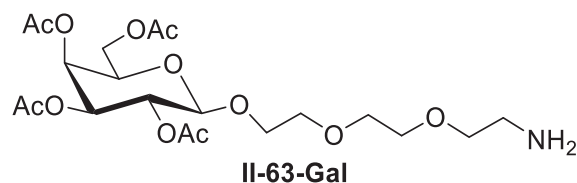
was added by portions and the solution was stirred at r.t. during 5 h. The reaction was monitored by TLC and the pH was adjusted to 1 by addition of HCl 10%. The reaction was cooled to 0°C and oxalic acid (2.46 g, 27.6 mmol, 20 eq.) was added by portions under vigorous stirring. The mixture started to become white after 2 h and it was further stirred overnight. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under vacuum. The solid was suspended in methanol and the residual salts were filtered off. The filtrate was collected and evaporated under vacuum affording 2,5-di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalic acid **II-62** (300 mg, 58%) as a pale amorphous yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): 8.09 (s, 2H, H_{Ar}), 3.14 (s, 6H, *NMe*₂), 3.01 (s, 6H, *NMe*₂).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 168.4 (s, 2C, CO₂H), 167.4 (s, 2C, COS), 139.6 (s, 2C, CH_{Ar}), 139.1 (s, 2C), 131.9 (s, 2C), 37.4; 37.3 (bs, 4C, *NMe*₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₁₄H₁₆N₂NaO₆S₂ : [M+Na]⁺ = 395.0342, found 395.0400.

1-Amino-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranoside **II-63-Gal**

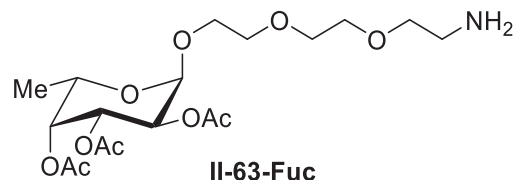


Prepared according to the general procedure **F** from azide **II-122-Gal** (455 mg) and Pd/C 10% (100 mg) affording a mixture of desired amine **II-63-Gal** and *N*-acetyl **II-75-Gal** (415 mg, 96%) as a colorless oil.

NMR for major compound : **II-63-Gal**

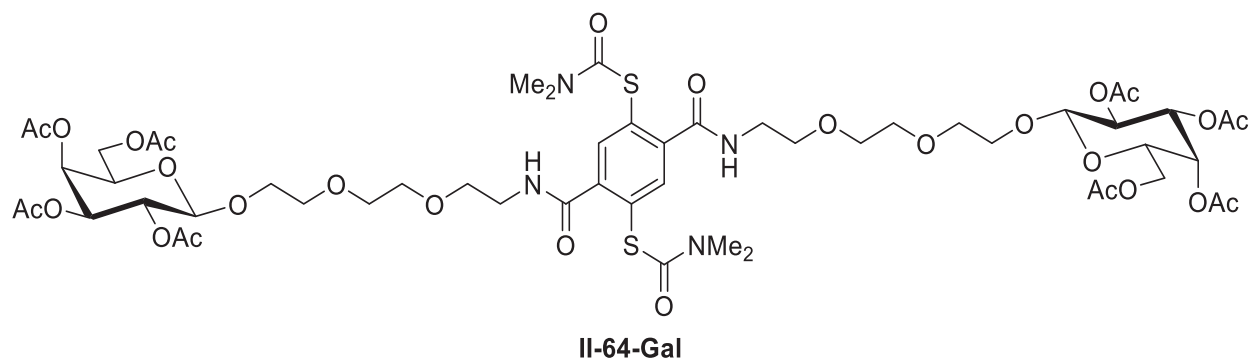
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.16 (bs, 2H, NH₂), 5.40 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H₄), 5.20-5.15 (m, 1H, H₂), 5.10-5.01 (m, 1H, H₃), 4.60 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₁), 4.24-4.10 (m, 2H, H₆), 4.05-3.95 (m, 2H, H₅ + CH₂OGal), 3.80-3.55 (m, 11H, NCH₂ + 4×CH₂O + CH₂OGal), 2.15; 2.06; 2.05; 1.98 (4×3H, COCH₃).

1-Amino-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-L-fucopyranoside **II-63-Fuc**



Prepared according to the general procedure **F** from azide **II-122-Fuc** (400 mg) and Pd/C 10% (100 mg) affording a mixture of desired amine **II-63-Fuc** and *N*-acetyl **II-75-Fuc** (426 mg, 99%) as a colorless oil.

2,5-Di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)-*N,N'*-di[3,6-dioxo-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-64-Gal**



Prepared according to the general procedure A from diacid **II-62** (100 mg), HOBT·H₂O (94 mg), EDCI (124 μ L), *i*Pr₂NEt (122 μ L) and galactopyranoside **II-63-Gal** (329 mg) affording terephthalamide **II-64-Gal** (264 mg, 75%) as a colorless oil.

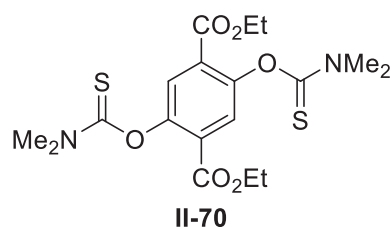
$R_f = 0.50$ (CH₂Cl₂/MeOH 95/5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.69 (s, 2H, H_{Ar}), 7.31(bs, 2H, NH), 5.35 (dd, $J = 0.9; 3.4$ Hz, 2H, H₄), 5.16 (dd, $J = 7.9; 10.5$ Hz, 2H, H₂), 5.00 (dd, $J = 3.4; 10.5$ Hz, 2H, H₃), 4.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H₁), 4.16-4.08 (m, 4H, H₆), 3.95-3.87 (m, 4H, H₅ + CH₂OGal), 3.72-3.54 (m, 21H, CH₂OGal + 4×CH₂O + NCH₂), 3.10 (s, 6H, NMe₂), 2.99 (s, 6H, NMe₂), 2.12; 2.03; 2.02; 1.96 (4×6H, COCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.5; 170.4; 170.2; 169.6 (4s, 8C, COCH₃), 167.3 (s, 2C, CONH), 166.7 (s, 2C, COS), 143.8 (s, 2C), 137.4 (s, 2C, CH_{Ar}), 127.9 (s, 2C), 101.4 (C₁), 71.0 (s, 2C, C₃), 70.73; 70.29; 70.28; 69.3 (4s, 8C, CH₂O), 70.72 (s, 2C, C₅), 69.2 (s, 2C, CH₂OGal), 68.9 (s, 2C, C₂), 67.2 (s, 2C, C₄), 61.4 (s, 2C, C₆), 39.7 (s, 2C, NCH₂), 37.5; 37.3 (2s, 4C, NMe₂), 20.9, 20.77, 20.76, 20.6 (4s, 8C, COCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₅₄H₇₈N₄NaO₂₈S₂ : [M+Na]⁺ = 1317.4136, found 1317.4133.

Diethyl 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalate **II-70**



Diethyl 2,5-dihydroxyterephthalate **II-69** (16 g, 62.9 mmol) and DABCO (28.2 g, 251.7 mmol, 4 eq.) were dissolved in dry DMA (160 mL) under inert atmosphere (N₂). *N,N*-Dimethylthiocarbamoyl chloride (31.1 g, 251.7 mmol, 4 eq.) dissolved in dry DMA (80 mL) was added dropwise at 0°C. The ice bath was removed and the mixture was stirred at r.t. during 17 h affording a white suspension. The precipitate was filtered off and washed with water

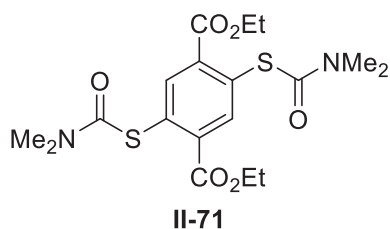
(5×400 mL) then dried in a freeze-drier affording diethyl 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalate **II-70** (26 g, 97%) as a white solid.

$R_f = 0.75$ (PE/EtOAc 70:30)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.73 (s, 2H, H_{Ar}), 4.30 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 3.46 (s, 6H, NMe_2), 3.40 (s, 6H, NMe_2), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_2CH_3).

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹²⁰

Diethyl 2,5-di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalate **II-71**

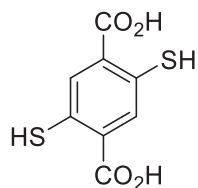


Diethyl 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalate **II-70** (3 g, 7 mmol) was heated with an oil bath at 215°C under an inert atmosphere (Ar). The compound slowly melted and when completed melting was achieved, heating was continued during 2 h. The brownish mixture was cooled to 70°C and EtOH (90 mL) was added. Brown crystals appeared as the solid was cooled down to r.t. The mixture was then cooled at 4°C during 2 h before the solid was filtered off and washed with cold EtOH (70 mL) and dried under vacuum to afford diethyl 2,5-di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalate **II-71** (2.26 g, 75%) as a brown solid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.11 (s, 2H, H_{Ar}), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 3.20-2.95 (m, 12H, NMe_2), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_2CH_3).

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹²⁰

2,5-Dimercaptoterephthalic acid **II-72 (A)**



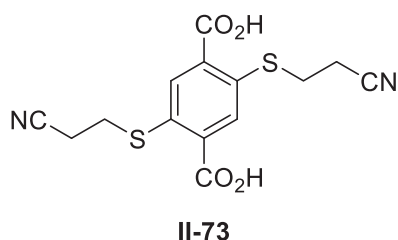
II-72 (A)

Diethyl 2,5-di(*N,N*-dimethylcarbamoylthio)terephthalate **II-71** (2.6 g, 6.06 mmol) in degassed 1.3M KOH in EtOH/ H_2O (40 mL, 1:1 v/v) was heated to reflux under an inert atmosphere (Ar) during 3 h. The reaction mixture was cooled down to 0°C then conc. HCl (30 mL) was slowly added. A bright yellow precipitate was formed, filtered and washed with water (5×40 mL) affording 2,5-dimercaptoterephthalic acid **II-72** (1.313 g, 94%) as a yellow solid.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): 8.04 (s, 2H, H_{Ar}).

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹²⁰

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-73**



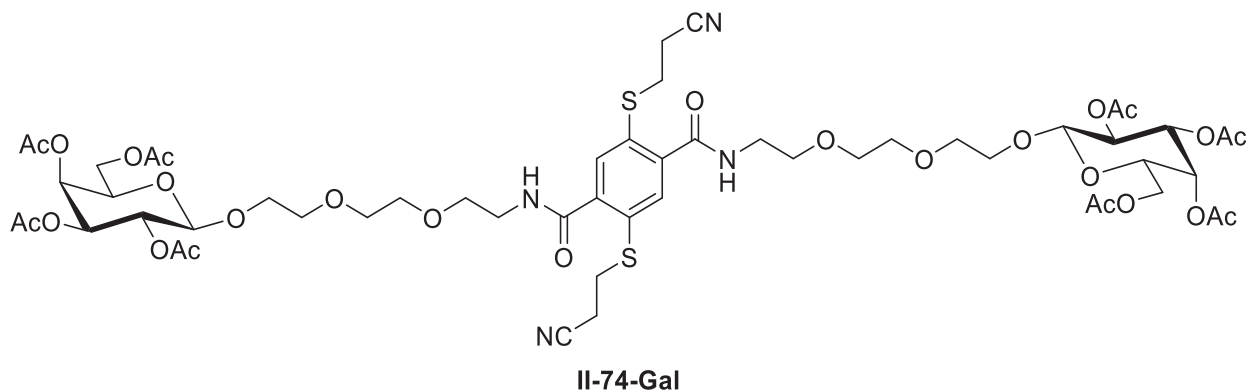
NaH (60% in mineral oil, 521 mg, 13.04 mmol, 6 eq.) was suspended in degassed anhydrous THF (5 mL) in a Schlenk tube. 2,5-Dimercaptoterephthalic acid **II-72** (500 mg, 2.17 mmol) previously dissolved in degassed and hot THF (10 mL, 66°C) was added. The mixture was stirred at r.t. during 1 h then 3-bromopropionitrile (3.6 mL, 43.4 mmol, 20 eq.) was added dropwise at r.t. The mixture was heated at 60°C during 44 h. The solvent was evaporated off and the yellow solid crude residue was suspended in CHCl_3 (50 mL) then filtered off using a hydrophobic membrane (5 μm). The solid was dried under vacuum then suspended in 1M HCl (40 mL) and sonicated. The precipitate was filtered off using a hydrophilic membrane (5 μm) and washed with water (5×20 mL). The solid was dried under vacuum to afford 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-73** (570 mg, 78%) as a bright yellow amorphous solid.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 13.62 (bs, 2H, CO_2H), 7.80 (s, 2H, H_{Ar}), 3.26 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H, SCH_2), 2.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H, CH_2CN).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 166.7 (s, 2C, CO_2H), 134.1 (s, 2C, C_{ArS}), 132.9 (s, 2C, $\text{C}_{\text{ArCO}_2\text{H}}$), 128.5 (s, 2C, CH_{Ar}), 119.2 (s, 2C, CN), 27.1 (s, 2C, SCH_2), 16.5 (s, 2C, CH_2CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 359.0131$, found 359.0145.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-74-Gal**



Prepared according to the general procedure **A** from terephthalic acid **II-73** (100 mg), HOBT·H₂O (119 mg), EDCI (137 μ L), *i*Pr₂N₂Et (135 μ L) and amine **II-63-Gal** (371 mg) affording the desired terephthalamide **II-74-Gal** (233 mg, 62%) as a brown oil.

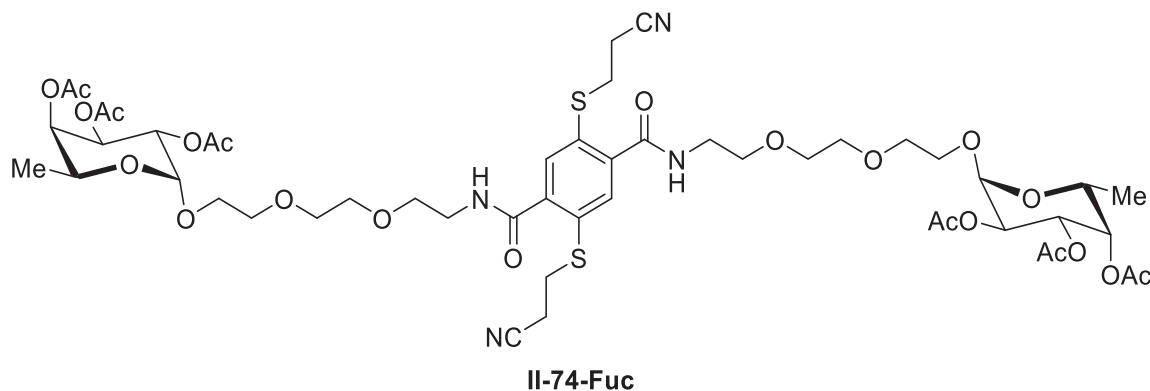
R_f = 0.50 (CHCl₃/MeOH 95:5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.69 (s, 2H, H_{Ar}), 7.16 (t, J = 5.2 Hz, 2H, NH), 5.37 (d, J = 3.4 Hz, 2H, H₄), 5.17 (dd, J = 7.9; 10.5 Hz, 2H, H₂), 5.00 (dd, J = 3.4; 10.5 Hz, 2H, H₃), 4.51 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H₁), 4.18-4.05 (m, 4H, H₆), 3.98-3.88 (m, 4H, CH₂OGal + H₅), 3.75-3.60 (m, 22H, CH₂OGal + 4×CH₂O + NCH₂), 3.19 (t, J = 7.0 Hz, 4H, SCH₂), 2.68 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH₂CN), 2.14; 2.05; 2.04; 1.98 (4×6H, COCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.6; 170.4; 170.3; 169.7 (4s, 8C, COCH₃), 166.7 (s, 2C, CONH), 140.3 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 132.3 (s, 2C, CH_{Ar}), 131.9 (s, 2C, C_{Ar}S), 118.1 (s, 2C, CN), 101.4 (s, 2C, C₁), 70.9 (s, 2C, C₃), 70.80; 70.4; 70.3; 69.7 (4s, 8C, CH₂O), 70.79 (s, 2C, C₅), 69.2 (s, 2C, CH₂OGal), 68.9 (s, 2C, C₂), 67.1 (s, 2C, C₄), 61.3 (s, 2C, C₆), 40.1 (s, 2C, NCH₂), 30.4 (s, 2C, SCH₂), 21.0; 20.85; 20.84; 20.7 (4s, 8C, COCH₃), 18.3 (s, 2C, CH₂CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₅₄H₇₄N₄Na₂O₂₆S₂ [M+2Na]²⁺ = 652.1909, found 652.1909.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-74-Fuc**



Prepared according to the general procedure **A** from terephthalic acid **II-73** (150 mg), HOBT·H₂O (178 mg), EDCI (206 μ L), *i*Pr₂NEt (202 μ L) and amine **II-63-Fuc** (448 mg) affording the desired terephthalamide **II-74-Fuc** (411 mg, 80%) as a brown oil.

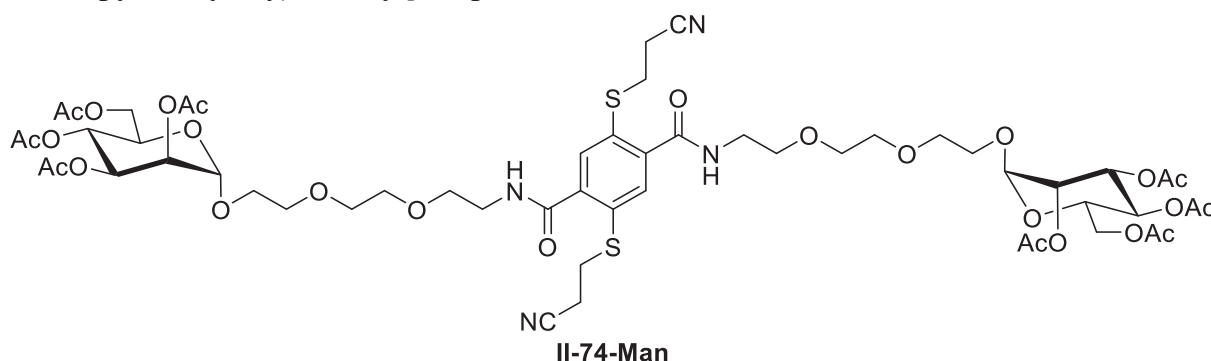
R_f = 0.50 (CHCl₃/MeOH 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.62 (s, 2H, H_{Ar}), 7.25 (bs, 2H, NH), 5.33-5.26 (m, 2H, H₂), 5.22 (m, 2H, H₄), 5.09-5.00 (m, 4H, H₁ + H₃), 4.17 (q, J = 6.6 Hz, 2H, H₅), 3.75-3.67 (m, 2H, CH₂OFuc), 3.67-3.55 (m, 22H, CH₂OFuc + 4×CH₂O + NCH₂), 3.14 (t, J = 7.0 Hz, 4H, SCH₂), 2.64 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH₂CN), 2.12; 2.01; 1.92 (3×6H, COCH₃), 1.08 (d, J = 6.6 Hz, H₆).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.7; 170.5; 170.3 (3s, 6C, COCH₃), 166.7 (s, 2C, CONH), 140.3 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 132.0 (s, 2C, CH_{Ar}), 131.7 (s, 2C, C_{Ar}S), 118.1 (s, 2C, CN), 96.2 (s, 2C, C₁), 71.2 (s, 2C, C₄), 70.7; 70.4; 70.1; 69.6 (4s, 8C, CH₂O), 68.2; 68.0 (2s, 4C, C₂ + C₃), 67.3 (s, 2C, CH₂OFuc), 64.4 (s, 2C, C₅), 40.0 (s, 2C, NCH₂), 30.2 (s, 2C, SCH₂), 20.9; 20.76; 20.70 (3s, 6C, COCH₃), 18.2 (s, 2C, CH₂CN), 15.9 (s, 2C, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₅₀H₇₁N₄O₂₂S₂ [M+H]⁺ = 785.2835, found 785.2831.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-74-Man**



Prepared according to the general procedure **A** from terephthalic acid **II-73** (50 mg), HOBT•H₂O (59 mg), EDCI (68 μ L), *i*Pr₂NEt (143 μ L) and amine **II-63-Man** (393 mg) affording the desired terephthalamide **II-74-Man** (112 mg, 60%) as a brown oil.

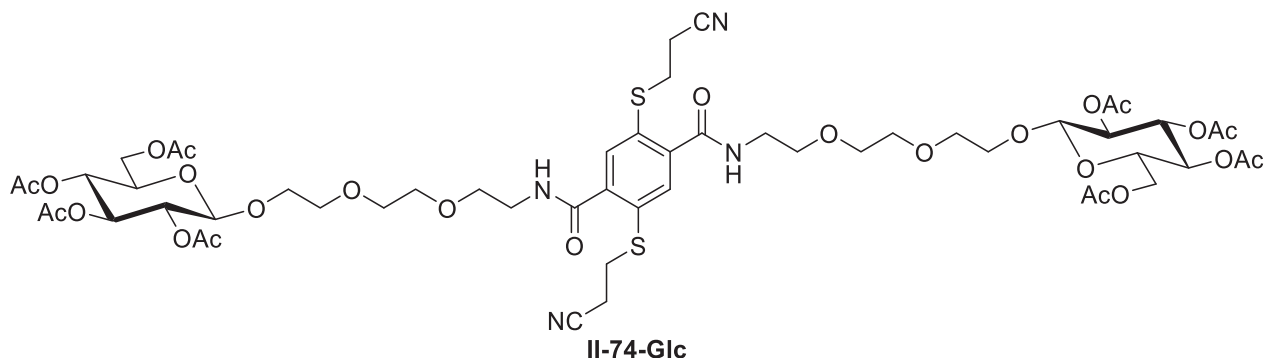
R_f = 0.50 (CHCl₃/MeOH 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.67 (s, 2H, H_{Ar}), 7.14 (bs, 2H, NH), 5.33-5.25 (m, 4H, H₃ + H₄), 5.22 (dd, J = 1.6; 3.0 Hz, 2H, H₂), 4.85 (d, J = 1.6 Hz, 2H, H₁), 4.25 (dd, J = 4.9; 12.1 Hz, 2H, H₆), 4.10-3.95 (m, 4H, H₅ + H_{6'}), 3.83-3.73 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{OMan}}$), 3.73-3.59 (m, 22H, $\underline{\text{CH}_2\text{OMan}}$ + 4 $\times$ CH₂O + NCH₂), 3.17 (t, J = 7.0 Hz, 4H, SCH₂), 2.66 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH₂CN), 2.13; 2.07; 2.02; 1.96 (4 $\times$ 6H, COCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.8; 170.3; 170.2; 169.8 (4s, 8C, $\underline{\text{COCH}_3}$), 166.8 (s, 2C, CONH), 140.4 (s, 2C, $\underline{\text{C}_{Ar}\text{CONH}}$), 132.2 (s, 2C, CH_{Ar}), 131.7 (s, 2C, C_{Ar}S), 118.1 (s, 2C, CN), 97.7 (s, 2C, C₁), 70.7; 70.4; 70.0; 69.7 (4s, 8C, CH₂O), 69.6 (s, 2C, C₂), 69.2; 66.1 (2s, 4C, C₃ + C₄), 68.5 (s, 2C, C₅), 67.3 (s, 2C, $\underline{\text{CH}_2\text{OMan}}$), 62.5 (s, 2C, C₆), 40.0 (s, 2C, NCH₂), 30.4 (s, 2C, SCH₂), 21.0; 20.88; 20.84; 20.82 (4s, 8C, $\underline{\text{COCH}_3}$), 18.3 (s, 2C, $\underline{\text{CH}_2\text{CN}}$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₅₄H₇₄N₄NaO₂₆S₂ [M+Na]⁺ = 1281.3925, found 1281.3927.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-74-Glc**



Prepared according to the general procedure **A** from terephthalic acid **II-73** (124 mg), HOBT·H₂O (146 mg), EDCI·HCl (182 mg), *i*Pr₂NEt (331 μ L) and amine **II-63-Glc** (455 mg) affording the desired terephthalamide **II-74-Glc** (189 mg, 40%) as a brown oil.

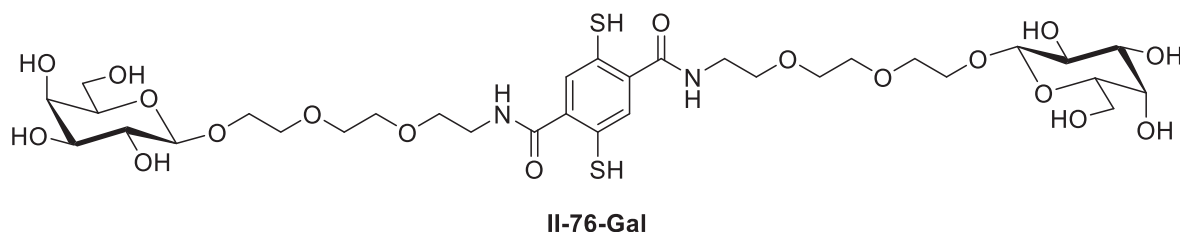
R_f = 0.50 (CHCl₃/MeOH 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.60 (s, 2H, H_{Ar}), 7.12 (t, J = 5.0 Hz, 2H, NH), 5.13 (dd, J = J' = 9.5 Hz, 2H, H₃), 5.00 (dd, J = J' = 9.5 Hz, 2H, H₄), 4.87 (dd, J = 8.0; 9.5 Hz, 2H, H₂), 4.50 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H₁), 4.17 (dd, J = 4.6; 12.3 Hz, 2H, H₆), 4.06 (dd, J = 2.4; 12.3 Hz, 2H, H_{6'}), 3.91-3.81 (m, 2H, CH₂OGlc), 3.70-3.53 (m, 22H, CH₂OGlc + 4×CH₂O + NCH₂), 3.13 (t, J = 7.0 Hz, 4H, SCH₂), 2.63 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH₂CN), 2.02; 1.97; 1.96; 1.94 (4×6H, COCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.5; 170.0; 169.36; 169.32 (4s, 8C, 4×COCH₃), 166.7 (s, 2C, CONH), 139.9 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 131.5 (s, 2C, C_{Ar}S), 131.3 (s, 2C, CH_{Ar}), 118.0 (s, 2C, CN), 100.5 (s, 2C, C₁), 72.5 (s, 2C, C₃), 71.6 (s, 2C, C₅), 71.1 (s, 2C, C₂), 70.4; 70.0; 69.9; 69.3 (4s, 8C, CH₂O), 68.9 (s, 2C, CH₂OGlc), 68.2 (s, 2C, C₄), 61.7 (s, 2C, C₆), 39.7 (s, 2C, NCH₂), 29.9 (s, 2C, SCH₂), 20.6; 20.5; 20.4 (3s, 8×C, COCH₃), 17.9 (s, 2C, CH₂CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₅₄H₇₄N₄NaO₂₆S₂ [M+Na]⁺ = 1281.3925, found 1281.3893.

2,5-Dimercapto-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-76-Gal (G)**



Prepared according to the general procedure **B** from protected dithiophenol **II-74-Gal** (89 mg) and CsOH·H₂O (238 mg, 20 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-76-Gal** (40 mg, 69 %) as a white foam.

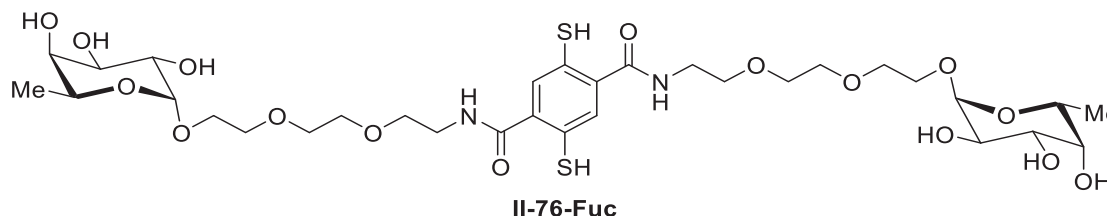
εTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, D₂O + εTFA): 7.50 (s, 2H, H_{Ar}), 4.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₁), 4.05-3.97 (m, 2H, CH₂OGal), 3.87 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H, H₄), 3.80-3.55 (m, 30 H, H₃ + H₅ + H₆ + CH₂OGal + 4×CH₂O + NCH₂), 3.47 (dd, *J* = 7.8; 9.9 Hz, 2H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O + εTFA): 169.7 (s, 2C, CONH), 135.7 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 130.0 (s, 2C, CH_{Ar}), 128.0 (s, 2C, C_{Ar}S), 102.8 (s, 2C, C₁), 75.0; 72.6; 70.7; 68.5 (4s, 8C, C₂ + C₃ + C₄ + C₅), 69.69; 69.60; 69.3; 68.6; 68.5 (5s, 10C, CH₂O + CH₂OGal), 60.8 (s, 2C, C₆), 39.3 (s, 2C, NCH₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₂H₅₂N₂NaO₁₈S₂ [M+Na]⁺ = 839.2549, found 839.2552.

**2,5-Dimercapto-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(α-L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide
II-76-Fuc (F)**



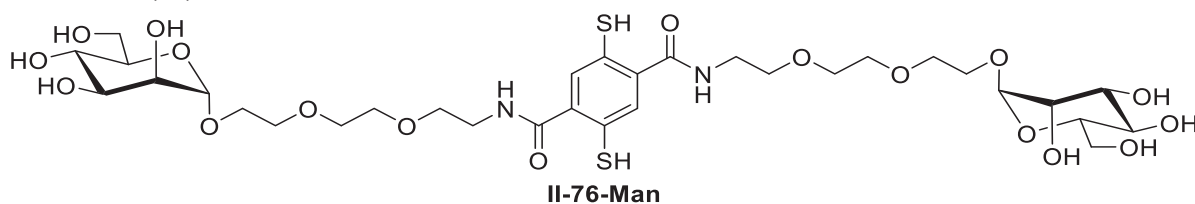
Prepared according to the general procedure **B** from protected dithiophenol **II-74-Fuc** (675 mg) and CsOH•H₂O (1.98 g, 20 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-76-Fuc** (420 mg, 91%).

εTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, D₂O + εTFA): 7.50 (s, 2H, H_{Ar}), 4.84 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, H₁), 4.0.2(q, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₅), 3.82-3.64 (m, 24 H, H₂ + H₃ + H₄ + CH₂OFuc + 4×CH₂O), 3.64-3.53 (m, 6H, CH₂OFuc + NCH₂), 1.16 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, H₆).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O + εTFA): 169.7 (s, 2C, CONH), 135.7 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 130.1 (s, 2C, CH_{Ar}), 128.2 (s, 2C, C_{Ar}S), 98.6 (s, 2C, C₁), 71.8; 69.5; 68.0 (3s, 6C, C₂ + C₃ + C₄), 69.7; 69.6; 69.4; 68.7 (4s, 8C, CH₂O), 66.8 (s, 2C, CH₂OFuc), 66.6 (s, 2C, C₅), 39.3 (s, 2C, NCH₂), 15.3 (s, 2C, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: calcd. for C₃₂H₅₃N₂O₁₆S₂ [M+H]⁺ = 785.2831, found 785.2835.

2,5-Dimercapto-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide
II-76-Man (M)


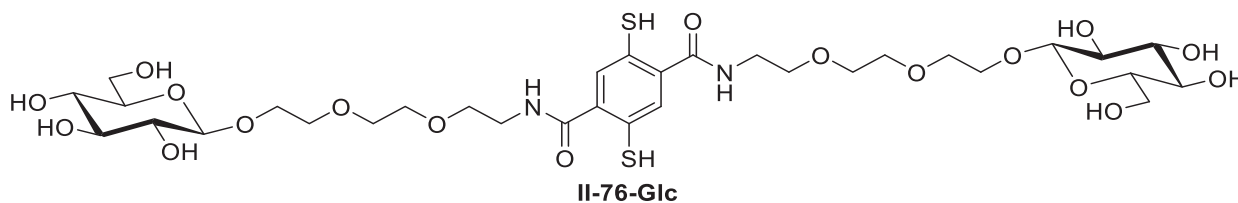
Prepared according to the general procedure **B** from protected dithiophenol **II-74-Man** (122 mg) and CsOH•H₂O (325 mg, 20 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-76-Man** (47 mg, 60%) as a white foam.

εTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, D₂O + εTFA): 7.94 (s, 2H, H_{Ar}), 4.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H, H₁), 3.90 (dd, *J* = *J'* = 1.7 Hz, 2H, H₂), 3.87-3.53 (m, 34 H, H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + CH₂OMan + 4×CH₂O + NCH₂).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O + εTFA): 169.7 (s, 2C, CONH), 135.6 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 130.0 (s, 2C, CH_{Ar}), 128.0 (s, 2C, C_{Ar}S), 99.8 (s, 2C, C₁), 72.6; 70.4; 69.9; 66.6 (4s, 8C, C₂ + C₃ + C₄ + C₅), 69.6; 69.47; 69.44; 68.6; 66.2 (5s, 10C, CH₂O + CH₂OMan), 60.8 (s, 2C, C₆), 39.4 (s, 2C, CH₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₂H₅₂N₂NaO₁₈S₂ [M+Na]⁺ = 839.2549, found 839.2552.

2,5-Dimercapto-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(β -D-glucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide
II-76-Glc (Glc)


Prepared according to the general procedure **B** protected dithiophenol **II-74-Glc** (90 mg) and CsOH•H₂O (240 mg, 20 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-76-Glc** (40 mg, 68 %) as a white foam.

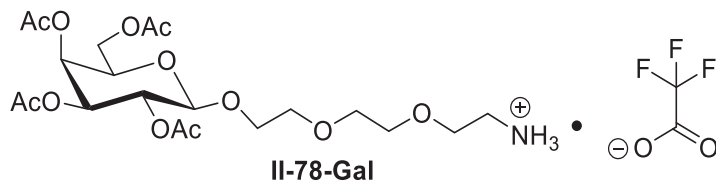
εTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, D₂O + εTFA) : 7.52 (s, 2H, H_{Ar}), 4.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₁), 4.04-3.97 (m, 2H, CH₂OGlc), 3.87 (dd, *J* = 2.2; 12.3 Hz, 2H, H₆), 3.80-3.70 (m, 18H, CH₂OGlc + 4×CH₂O), 3.66 (dd, *J* = 5.8; 12.3 Hz, 2H, H_{6'}), 3.59 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, NCH₂), 3.48-3.41 (m, 2H, H₃), 3.39 (dd, *J* = 2.2; 5.8 Hz, 2H, H₅), 3.37-3.31 (m, 2H, H₄), 3.24 (dd, *J* = 8.0, 9.3 Hz, 2H, H₂).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \epsilon\text{TFA}$): 169.7 (s, 2C, CONH), 135.7 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 130.1 (s, 2C, CH_{Ar}), 128.0 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$), 102.2 (s, 2C, C_1), 75.8; 75.6; 73.0; 69.5 (4s, 8C, $\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4 + \text{C}_5$), 69.6, 69.5, 69.3, 68.6 (4s, 5C, $\text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGlc}$), 60.7 (s, 2C, C_6), 39.4 (s, 2C, NCH_2).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{NaO}_{18}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 839.2549$, found 839.2553.

1-Ammonium-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside trifluoroacetate II-78-Gal

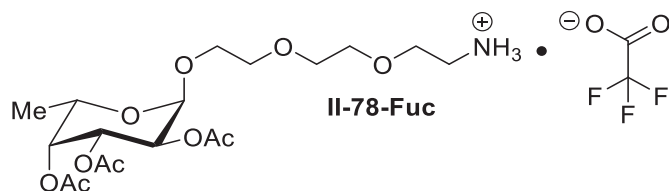


Prepared according to the general procedure **E** from Boc-amine **II-141-Gal** (580 mg) affording the desired product ammonium **II-78-Gal** and residual TFA (620 mg, >95%) as a slightly brown oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.40 (bs, 3H, NH_3), 5.36 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_4), 5.05-4.98 (m, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_3$), 4.48 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_1), 4.16 (dd, $J = 6.7$; 11.3 Hz, 1H, H_6), 4.05 (dd, $J = 6.6$; 11.3 Hz, 1H, H_6'), 3.97-3.89 (m, 2H, $\text{H}_5 + \text{CH}_2\text{OGal}$), 3.80-3.55 (m, 9H, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 3.26 (bs, 2H, NCH_2), 2.10; 2.02; 2.00; 1.94 ($4 \times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.98; 170.90; 170.4; 170.3 (4C, COCH_3), 101.6 (C_1), 71.1 (C_5), 70.5; 69.1 ($\text{C}_2 + \text{C}_3$), 70.3; 70.0; 69.9; 66.6 (4C, CH_2O), 69.3 (CH_2OGal), 67.1 (C_4), 61.3 (C_6), 40.2 (NCH_2), 20.6; 20.5; 20.43; 20.40 (COCH_3).

1-Ammonium-3,6-dioxa-8-yl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-L-fucopyranoside trifluoroacetate II-78-Fuc

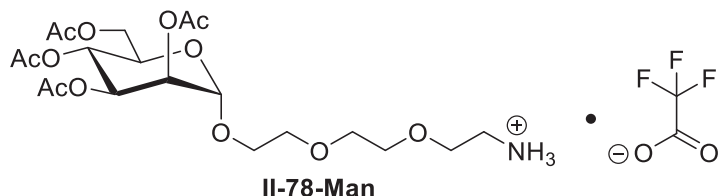


Prepared according to the general procedure **E** from Boc-amine **II-141-Fuc** (190 mg) affording the desired product ammonium **II-78-Fuc** and residual TFA (208 mg, >95%) as a slightly brown oil.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.85 (s, 3H, NH_3), 5.31-5.22 (m, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_4$), 5.10-5.02 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_3$), 4.15 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H_5), 3.85-3.55 (m, 10H, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OFuc}$), 3.18 (bs, 2H, NCH_2), 2.11; 2.03; 1.93 ($3 \times \text{C}$, COCH_3), 1.08 (d, $J = 6.5$ Hz, H_6).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.69; 170.62 ($3\times\text{C}$, COCH_3), 95.9 (C_1), 71.2 (C_4), 70.2; 69.94; 69.90; 66.7; 66.5 ($5\times\text{C}$, $4\times\text{CH}_2\text{O}$ + CH_2OFuc) 68.4 (C_3), 68.0 (C_2), 64.6 (C_5), 69.7 (NCH_2), 20.66; 20.62 (2s, $3\times\text{C}$, COCH_3), 15.8 (C_6).

1-Ammonium-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranoside trifluoroacetate **II-78-Man**

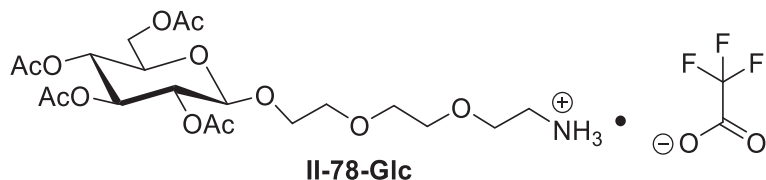


Prepared according to the general procedure **E** from Boc-amine **II-141-Man** (500 mg) affording the desired ammonium **II-78-Man** and residual TFA (541 mg, >95%) as a slightly brown oil.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.85 (bs, 3H, NH_3), 5.32-5.16 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4$), 4.84 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H_1), 4.23 (dd, $J = 5.0$; 12.3 Hz, 1H, H_6), 4.11-4.04 (m, 1H, H_6'), 4.02-3.95 (m, 1H, H_5), 3.85-3.55 (m, 10H, $4\times\text{CH}_2\text{O}$ + CH_2OMan), 3.20 (bs, 2H, NCH_2), 2.11; 2.06; 2.01; 1.95 ($4\times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.86; 170.83; 170.4; 169.8 ($4\times\text{C}$, COCH_3), 97.5 (C_1), 70.3; 70.1; 69.7; 67.0; 66.5 ($5\times\text{C}$, $4\times\text{CH}_2\text{O}$ + CH_2OMan), 69.5; 69.4; 65.8 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4$), 68.7 (C_5), 62.6 (C_6), 39.9 (NCH_2), 20.9; 20.76; 20.70; 20.6 ($4\times\text{C}$, COCH_3).

1-Ammonium-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside trifluoroacetate **II-78-Glc**

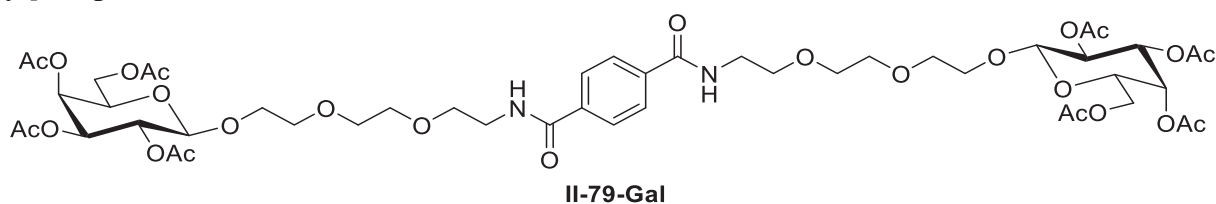


Prepared according to the general procedure **E** from Boc-amine **II-141-Glc** (552 mg) affording the desired ammonium **II-78-Glc** and residual TFA (589 mg, >95%) as a slightly brown oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.82 (bs, 3H, NH_3), 5.15 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, H_3), 5.01 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, H_4), 4.92 (dd, $J = 8.0$; 9.5 Hz, 1H, H_2), 4.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1), 4.22 (dd, $J = 4.8$; 12.3 Hz, 1H, H_6), 4.09 (dd, $J = 2.2$; 12.3 Hz, 1H, H_6'), 3.91 (m, 1H, CH_2OGlc), 3.72-3.55 (m, 10H, $\text{H}_5 + 4\times\text{CH}_2\text{O}$ + CH_2OGlc), 3.17 (bs, 2H, NCH_2), 2.02; 1.99 1.97; 1.94 ($4\times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.9; 170.2; 170.0; 169.5 (4C , COCH_3), 101.0 (C_1), 72.6 (C_3), 72.0 (C_5), 71.3 (C_2), 70.3; 70.0; 69.9; 66.7 (4C , CH_2O), 69.2 (CH_2OGlc), 68.4 (C_4), 61.9 (C_6), 39.8 (NCH_2), 20.7; 20.59; 20.56; 20.53 (COCH_3).

N,N'*-Di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-79-Gal*



Prepared according to the general procedure **G** from terephthalic acid **II-77** (28 mg), HCTU (134 mg), *i*Pr₂NEt (58 μ L + 233 μ L) and ammonium **II-78-Gal** (199 mg) affording terephthalamide **II-79-Gal** (79 mg, 43%) as a colorless oil.

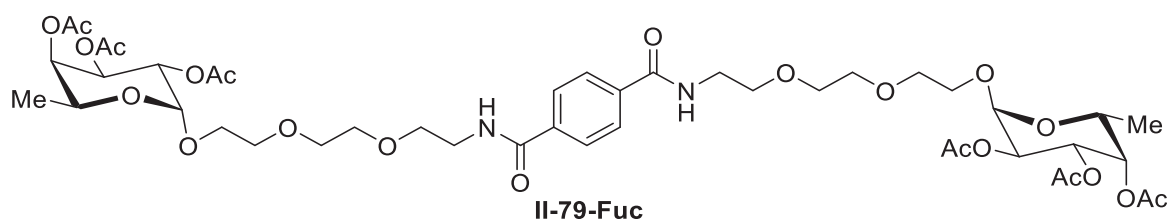
R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.85 (s, 4H, H_{Ar}), 7.03 (bs, 2H, NH), 5.33 (d, J = 3.3 Hz, 2H, H₄), 5.15 (dd, J = 7.9; 10.5 Hz, 2H, H₂), 4.97 (dd, J = 3.3; 10.5 Hz, 2H, H₃), 4.48 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H₁), 4.16-4.02 (m, 4H, H₆) 3.96-3.84 (m, 4H, H₅ + $\underline{\text{CH}_2\text{OGal}}$), 3.72-3.54 (m, 22H, NCH₂ + 4 $\times$ CH₂O + $\underline{\text{CH}_2\text{OGal}}$), 2.07; 2.00; 1.99; 1.93 (4 $\times$ 6H, COCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.4; 170.3; 170.1; 169.6 (4s, 8C, $\underline{\text{COCH}_3}$), 166.3 (s, 2C, CONH), 137.1 (s, 2C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 127.4 (s, 4C, CH_{Ar}), 101.4 (s, 2C, C₁), 70.9 (s, 2C, C₃), 70.7 (s, 2C, C₅), 70.6; 70.2; 70.1; 69.7; 69.2 (5s, 10C, 4 $\times$ CH₂O + $\underline{\text{CH}_2\text{OGal}}$), 68.9 (s, 2C, C₂), 67.1 (s, 2C, C₄), 61.3 (s, 2C, C₆), 39.9 (s, 2C, NCH₂), 20.8; 20.7; 20.64; 20.61 (4s, 8C, $\underline{\text{COCH}_3}$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₄₈H₆₈N₂Na₂O₂₆ : [M+Na]⁺ = 1111.3953, found 1111.3898.

N,N'*-Di[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-79-Fuc*



Prepared according to the general procedure **G** from terephthalic acid **II-77** (29 mg), HCTU (160 mg), *i*Pr₂NEt (60 μ L + 242 μ L) and ammonium **II-78-Fuc** (188 mg) affording terephthalamide **II-79-Fuc** (52 mg, 26%) as a colorless oil.

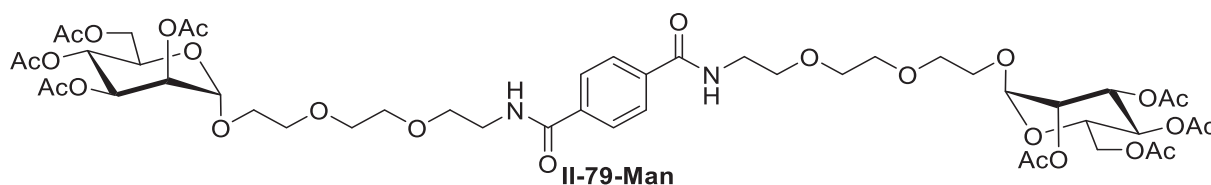
R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.85 (s, 4H, H_{Ar}), 6.98 (bs, 2H, NH), 5.37-5.24 (m, 4H, H₂ + H₄), 5.13-5.04 (m, 4H, H₁ + H₃), 4.21 (q, J = 6.5 Hz, 2H, H₅), 3.80-3.60 (m, 24H, NCH₂ + 4 $\times$ CH₂O + CH₂OFuc), 2.14; 2.03; 1.96 (3 $\times$ 6H, COCH₃), 1.10 (d, J = 6.5 Hz, 6H, H₆).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.6; 170.4 (3s, 6C, COCH_3), 166.8 (s, 2C, CONH), 137.2 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 127.4 (s, 2C, CH_{Ar}), 96.3 (s, 2C, C_1), 71.3 (s, 2C, C_4), 70.8; 70.4; 70.3; 70.0 (4s, 8C, CH_2O), 68.3 (s, 2C, C_3), 68.1 (s, 2C, C_2), 67.4 (s, 2C, CH_2OFuc), 64.5 (s, 2C, C_5), 40.0 (s, 2C, NCH_2), 20.9; 20.8; 20.7 (3s, 6C, COCH_3), 16.0 (s, 2C, C_6).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{NaO}_{22}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 995.3843$, found 995.3844.

N,N'*-Di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-79-Man*



Prepared according to the general procedure **G** from terephthalic acid **II-77** (37 mg), HCTU (203 mg), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (78 μL + 308 μL) and ammonium **II-78-Man** (264 mg) affording terephthalamide **II-79-Man** (115 mg, 47%) as a colorless oil.

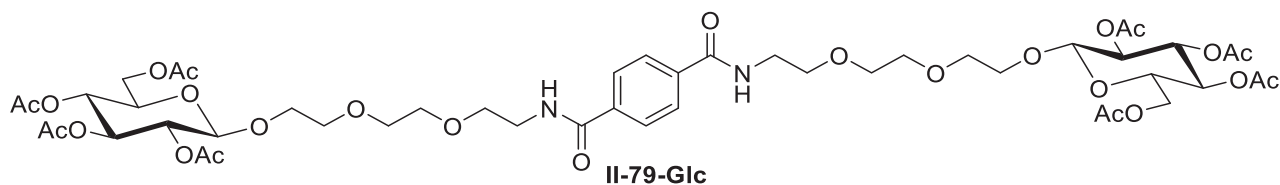
$R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.83 (s, 4H, H_{Ar}), 7.07 (bs, 2H, NH), 5.33-5.20 (m, 6H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4$), 4.82 (s, 2H, H_1), 4.22 (dd, $J = 4.8$; 12.3 Hz, 2H, H_6), 4.10-3.98 (m, 4H, $\text{H}_5 + \text{H}_6'$), 3.83-3.71 (m, 2H, CH_2OMan), 3.70-3.55 (m, 22H, $\text{NCH}_2 + 4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OMan}$), 2.11; 2.05; 1.99; 1.94 (4 $\times$ 6H, COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.7; 170.16; 170.11; 169.7 (4s, 8C, COCH_3), 166.7 (s, 2C, CONH), 137.1 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 127.3 (s, 2C, CH_{Ar}), 97.7 (s, 2C, C_1), 70.6; 70.3; 70.0; 69.8 (4s, 8C, CH_2O), 69.6; 69.1; 66.1 (3s, 6C, $\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4$), 68.4 (s, 2C, C_5), 67.4 (s, 2C, CH_2OMan), 62.4 (s, 2C, C_6), 39.9 (s, 2C, NCH_2), 20.9; 20.79; 20.73; (3s, 8 $\times$ C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{NaO}_{26}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1111.3953$, found 1111.3964.

N,N'*-Di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-79-Glc*



Prepared according to the general procedure **G** from terephthalic acid **II-77** (40 mg), HCTU (216 mg), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (83 μL + 332 μL) and ammonium **II-78-Glc** (283 mg) affording terephthalamide **II-79-Glc** (174 mg, 67%) as a colorless oil.

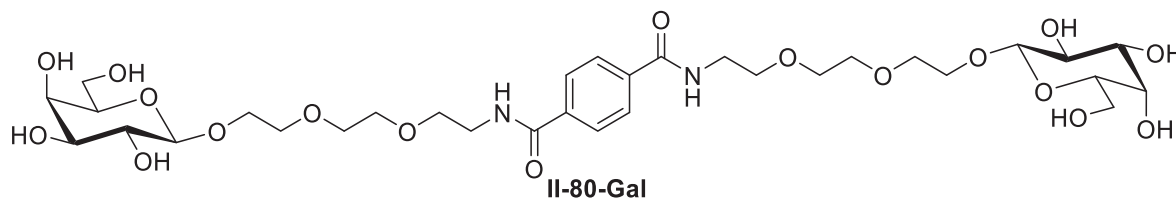
$R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.85 (s, 4H, H_{Ar}), 6.99 (bs, 2H, NH), 5.18 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 2H, H_3), 5.05 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 2H, H_4), 4.95 (dd, $J = 7.9$; 9.5 Hz, 2H, H_2), 4.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_1), 4.23 (dd, $J = 4.8$; 12.3 Hz, 2H, H_6), 4.11 (dd, $J = 2.5$; 12.3 Hz, 2H, H_6'), 3.96-3.88 (m, 4H, $\text{H}_5 + \text{CH}_2\text{OGlc}$), 3.73-3.58 (m, 22H, $\text{NCH}_2 + 4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGlc}$), 2.05; 2.01; 2.00; 1.98 (4 $\times$ 6H, COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.7; 170.4; 169.54; 169.52 (4s, 8C, COCH_3), 166.7 (s, 2C, CONH), 137.2 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 127.4 (s, 4C, CH_{Ar}), 100.9 (s, 2C, C_1), 72.8 (s, 2C, C_3), 71.9 (s, 2C, C_5), 71.4 (s, 2C, C_2), 70.7; 70.3; 70.2; 69.8; 69.2, (5s, 10C, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGlc}$), 68.5 (s, 2C, C_4), 62.0 (s, 2C, C_6), 40.0 (s, 2C, NCH_2), 20.8; 20.78; 20.71; 20.70 (4s, 8C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{NaO}_{26}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1111.3953$, found 1111.3958.

N,N'*-Di[3,6-dioxa-8-(β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-80-Gal*

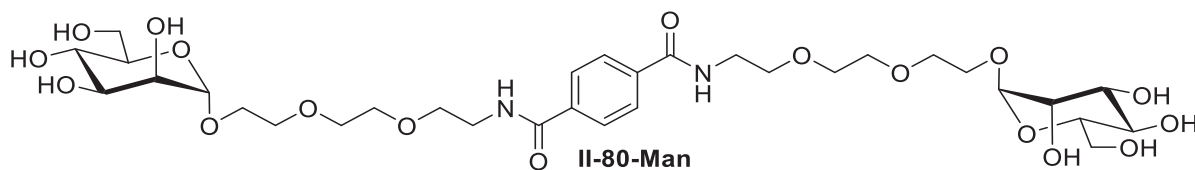


Prepared according to the general procedure **B** from peracetylated di-galactoside **II-79-Gal** (74 mg) and $\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (137 mg, 12 eq.) affording the desired product di-galactoside **II-80-Gal** (18 mg, 35 %) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.84 (s, 4H, H_{Ar}), 4.28 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_1), 4.07-4.02 (m, 2H, H_4), 3.86 (dd, $J = 0.9$; 3.3 Hz,) 3.82-3.68 (m, 21H, $\text{H}_6 + 4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 3.66-3.63 (m, 4H, NCH_2), 3.61-3.49 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_5$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 168.0 (s, 2C, CONH), 136.9 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 127.2 (s, 4C, CH_{Ar}), 103.7 (s, 2C, C_1), 75.3; 73.5; 71.1 (3s, 6C, $\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_5$), 70.09; 70.08; 69.8; 69.1 (4s, 8C, CH_2O), 68.9 (C_4), 68.2 (s, 2C, CH_2OGal), 61.1 (s, 2C, C_6), 69.7 (s, 2C, NCH_2).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{NaO}_{18}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 775.3107$, found 775.3119.

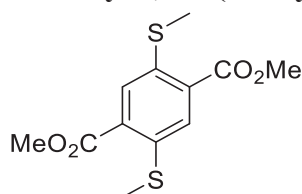
N,N'*-Di[3,6-dioxa-8-(α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-80-Man*


Prepared according to the general procedure **B** from peracetylated di-mannoside **II-79-Man** (120 mg) and CsOH•H₂O (222 mg, 12 eq.) affording the desired di-mannoside **II-80-Man** (65 mg, 77 %) as a white foam.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 7.92 (s, 4H, H_{Ar}), 4.78 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H₁), 3.87-3.78 (m, 6H, H₂ + H₆ + CH₂OMan), 3.72-3.55 (m, 30H, H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + CH₂OMan + 4×CH₂ + NCH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 169.5 (s, 2C, CONH), 138.4 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 128.6 (s, 4C, CH_{Ar}), 101.8 (s, 2C, C₁), 74.7; 72.6; 72.1; 68.6 (4s, 8C, C₂ + C₃ + C₄ + C₅), 71.6; 71.4; 71.3; 70.6 (4s, 8C, CH₂O), 67.7 (s, 2C, CH₂OMan), 63.0 (s, 2C, C₆), 41.1 (s, 2C, NCH₂).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₂H₅₂N₂NaO₁₈ : [M+Na]⁺ = 775.3107, found 775.3105.

Dimethyl 2,5-di(methylthio)terephthalate **II-81**

II-81

KOH (732 mg, 13 mmol, 10 eq.) was dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry degassed DMSO (6 mL) and stirred at r.t. After 30 min, a solution of 2,5-dimercaptoterephthalic acid **II-72** (300 mg, 1.3 mmol) in dry degassed DMSO (9 mL) was added to the solution. After 15 min, iodomethane (1.6 mL, 26 mmol, 20 eq.) was added dropwise and the yellow mixture was stirred at r.t. during 19 h. The reaction was quenched with ice (20 g) and water (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3×50 mL). The organic layers were combined and washed with brine (5×50 mL). The resulting organic layer was dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 80:20) affording dimethyl 2,5-di(methylthio)terephthalate **II-81** (253 mg, 68%) as a green amorphous solid.

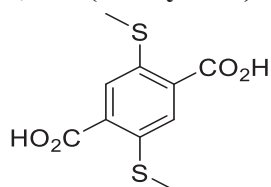
*R*_f = 0.90 (EtOAc)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.84 (s, 2H, H_{Ar}), 3.94 (s, 6H, CO_2CH_3), 2.48 (s, 6H, SCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 166.3 (s, 2C, CO_2CH_3), 138.1 (s, 2C, C_{ArS}), 130.5 (s, 2C, C_{ArCO_2}), 127.6 (s, 2C, CH_{Ar}), 52.7 (s, 2C, CO_2CH_3), 16.0 (s, 2C, SCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NaO}_4\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 309.0226$, found 309.0218.

2,5-Di(methylthio)terephthalic acid **II-82**



II-82

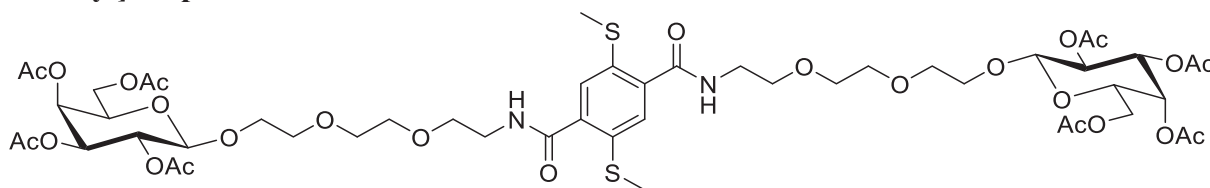
Dimethyl 2,5-di(methylthio)terephthalate **II-81** (100 mg, 0.35 mmol) was suspended in a solution of 0.34M KOH (40 mL, *i*-PrOH/ H_2O , 1:1 v/v). The mixture was heated to reflux during 15 h. After cooling, 1M HCl was added to reach pH 1 and the resulting solution was evaporated. The residue was suspended in 1M HCl (10 mL), filtered and washed with water (10 mL). The resulting precipitate was dried under vacuum affording 2,5-di(methylthio)terephthalic acid **II-82** (90 mg, >95%) as a yellow amorphous solid.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.76 (s, 2H, H_{Ar}), 2.42 (s, 6H, SCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 166.3 (s, 2C, CO_2H), 137.1 (s, 2C, C_{ArS}), 131.5 (s, 2C, C_{ArCO_2}), 127.1 (s, 2C, CH_{Ar}), 15.2 (s, 2C, SCH_3).

HR-ESI-MS (negative mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4\text{S}_2$: $[\text{M}-\text{H}]^- = 256.9948$, found 256.9936.

2,5-Di(methylthio)-*N,N'*-di[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]terephthalamide **II-83-Gal**



II-83-Gal

Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di(methylthio)terephthalic acid **II-82** (42 mg), HCTU (147 mg), *i*Pr₂NEt (56 μL + 226 μL) and ammonium **II-78-Gal** (193 mg) affording terephthalamide **II-83-Gal** (140 mg, 81%) as a colorless oil.

$R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

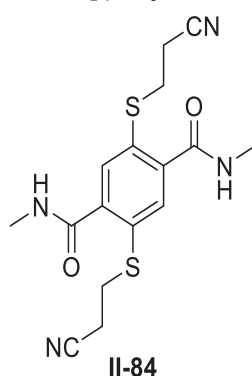
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.47 (s, 2H, H_{Ar}), 7.07 (bs, 2H, NH), 5.33 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H, H_4), 5.13 (dd, $J = 7.9$; 10.4 Hz, 2H, H_2), 4.97 (dd, $J = 3.3$; 10.4 Hz, 2H, H_3), 4.47 (d, $J = 7.9$ Hz,

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 4.16-4.02 (m, 4H, H_6), 3.94-3.82 (m, 4H, $\text{H}_5 + \text{CH}_2\text{OGal}$), 3.72-3.54 (m, 22H, $\text{NCH}_2 + 4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 2.42 (s, 6H, SCH_3), 2.10; 2.00; 1.93 ($4 \times 6\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.4; 170.3; 170.1; 169.5 (4s, 8C, COCH_3), 167.0 (s, 2C, CONH), 137.1 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 133.9 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$), 128.0 (s, 2C, CH_{Ar}), 101.3 (s, 2C, C_1), 70.9 (s, 2C, C_3), 70.72, 70.4, 70.2, 69.7, 69.1 (5s, 10C, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 70.69 (s, 2C, C_5), 68.9 (s, 2C, C_2), 67.1 (s, 2C, C_4), 61.3 (s, 2C, C_6), 39.9 (s, 2C, NCH_2), 20.8; 20.71; 20.69; 20.61 (4s, 8C, COCH_3), 17.0 (s, 2C, SCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{26}\text{S}_2$: $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+} = 613.1800$, found 613.1819.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-dimethylterephthalamide **II-84**



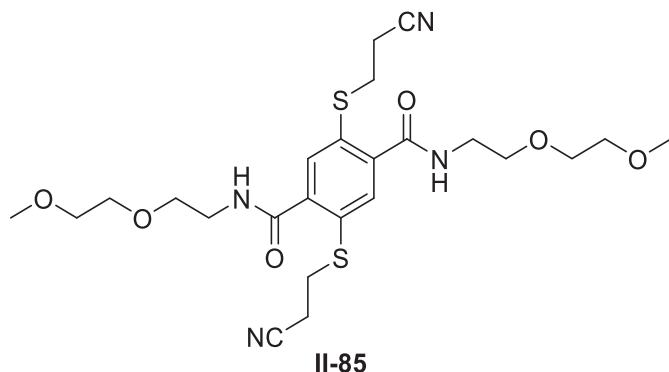
Prepared according to the general procedure **A** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-73** (200 mg), $\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (237 mg), $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ (297 mg), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (270 μL) and methylamine (2M in THF, 775 μL) affording 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-dimethylterephthalamide **II-84** (100 mg, 46%) as a white amorphous solid.

$R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 8.40 (q, $J = 4.6$ Hz, 2H, NH), 7.41 (s, 2H, H_{Ar}), 3.22 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, SCH_2), 2.81 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, CH_2CN), 2.76 (d, $J = 4.6$ Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 167.0 (s, 2C, CONH), 138.8 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}$), 131.3 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$), 127.6 (s, 2C, CH_{Ar}), 119.4 (s, 2C, CN), 28.0 (s, 2C, SCH_2), 26.0 (s, 2C, CH_3), 17.1 (s, 2C, CH_2CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 363.0944$, found 363.0946.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]terephthalamide II-85

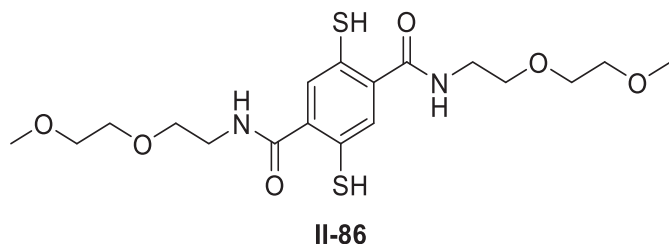
Prepared according to the general procedure **A** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]terephthalic acid **II-73** (100 mg), HOBT·H₂O (119 mg), EDC·HCl (148 mg), *i*Pr₂NEt (270 μL) and 2-(2-methoxyethoxy)ethanamine (92 mg) affording 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]-*N,N'*-di[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]terephthalamide **II-85** (106 mg, 66%) as a brown oil.

$R_f = 0.40$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.58 (s, 2H, H_{Ar}), 7.18 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, NH), 3.68-3.56 (m, 12H, NCH₂ + 2×CH₂O), 3.54-3.47 (m, 2H, CH₂OCH₃), 3.29 (s, 6H, CH₃), 3.12 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, SCH₂), 2.62 (t, $J = 7$ Hz, 4H, CH₂CN).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 166.6 (s, 2C, CONH), 140.0 (s, 2C, C_{Ar}CONH), 131.73 (s, 2C, C_{Ar}S), 131.71 (s, 2C, CH_{Ar}), 118.0 (s, 2C, CN), 71.9 (s, 2C, CH₂OCH₃), 70.2; 69.4 (2s, 4C, CH₂O), 58.9 (s, 2C, CH₃), 39.9 (s, 2C, NCH₂), 30.17 (s, 2C, SCH₂), 18.1 (s, 2C, CH₂CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₂₄H₃₄N₄NaO₆S₂ : [M+Na]⁺ = 561.1812, found 561.1796.

2,5-Dimercapto-*N,N'*-di[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]terephthalamide II-86 (P)

Prepared according to the general procedure **B** from protected dithiophenol **II-85** (106 mg) and CsOH·H₂O (397 mg, 20 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-86** (65 mg, 76%) as a white foam.

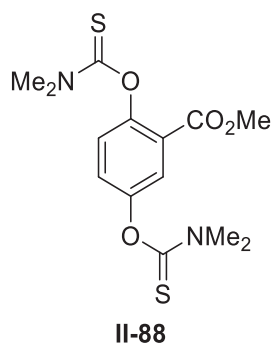
εTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ + εTFA): 7.50 (s, 2H, H_{Ar}), 3.57-3.50 (m, 4H, CH₂CH₂OCH₃ + NCH₂CH₂), 3.47-3.43 (m, 2H, CH₂OCH₃), 3.39-3.35 (m, 2H, NCH₂), 3.24 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6 + \epsilon\text{TFA}$): 166.8 (CONH), 134.9 (s, 2C), 129.8 (s, 2C), 128.9 (s, 2C), 71.3 (CH_2OCH_3), 69.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 68.7 (s, 2C, NCH_2CH_2), 58.1 (s, 2C, CH_3), 39.1 (NCH_2).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 455.1281$, found 455.1264.

Methyl 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)benzoate **II-88**



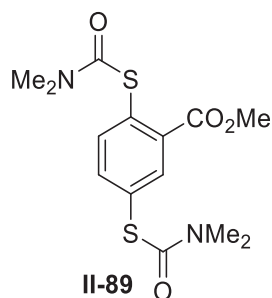
Methyl 2,5-dihydroxybenzoate **II-87** (2 g, 11.9 mmol) and DABCO (5.3 g, 47.5 mmol, 4 eq.) were dissolved under inert atmosphere (N_2) in dry DMA (40 mL) and cooled to 0°C . *N,N*-dimethylthiocarbamoyl chloride (5.9 g, 47.5 mmol, 4 eq.) dissolved in dry DMA (20 mL) was added and the reaction mixture was allowed to warm to r.t. before being stirred during 22 hours. The formation of a white precipitate was observed. The reaction was quenched with water (200 mL) and the precipitate was filtered and washed with water (400 mL) affording methyl 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)benzoate **II-88** (3.67 g, 90%) as a white amorphous solid.

$R_f = 0.4$ (EtOAc/Cyclohexane 80:20)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.70 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.28 (dd, $J = 2.9$; 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 7.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 3.82 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.46; 3.45; 3.39; 3.34 (4 $\times$ 3H, NCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 365.0600$, found 365.0593.

Methyl 2,5-di[(*N,N*-dimethylcarbamoyl)thio]benzoate **II-89**



Methyl 2,5-di(*N,N*-dimethylthiocarbamoyloxy)benzoate **II-88** (6 g, 17.5 mmol) was dissolved under inert atmosphere in diphenyl ether (67 mL). The suspension was heated at 240°C during 5 h before being cooled down to r.t. The solution was poured in cyclohexane (300 mL) and a

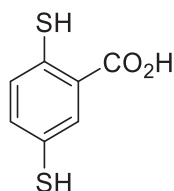
precipitate was observed. The solid was filtered off and washed with warm cyclohexane affording methyl 2,5-di[(*N,N*-dimethylcarbamoyl)thio]benzoate **II-89** (4.5 g, 75%) as a beige amorphous solid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.03 (dd, $J = 0.5$; 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.62 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.59 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H_{Ar}), 3.86 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.19-2.97 (bs, 4×3H, NMe_2).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): 166.3 (CO_2CH_3), 165.87; 165.83, (2C, $\text{C}=\text{O}$), 138.2; 137.4; 137.3 (3C, CH_{Ar}), 134.9, 131.5, 130.3, 52.5 (CO_2CH_3), 37.2; 37.1 (2s, 4C, NMe_2).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 365.0600$, found 365.0595.

2,5-Dimercaptobenzoic acid **II-90**



II-90

2,5 di[(*N,N*-dimethylcarbamoyl)thio]benzoate **II-89** (1 g, 2.9 mmol) in degassed 1.3M KOH in EtOH/ H_2O (30 mL, 1:1 v/v) was heated to reflux under an inert atmosphere (Ar) during 3 h. The reaction mixture was cooled down to 0°C then conc. HCl (20 mL) was slowly added. A yellow precipitate was formed, filtered and washed with water (5×30 mL) affording 2,5-dimercaptobenzoic acid **II-90** (375 g, 69%) as a yellow amorphous solid.

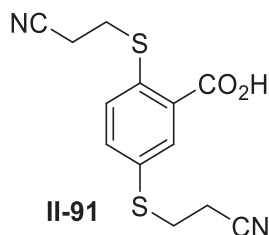
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): 7.94 (dd, $J = J' = 1.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{Ar}}$), 7.27 (d, $J = 1.3$ Hz, 2H, $\text{H}_{3\text{Ar}} + \text{H}_{4\text{Ar}}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): 169.2 (CO_2H), 136.7 ($\text{C}_{1\text{Ar}}$), 134.3; 132.5 (2C, $\text{C}_{3\text{Ar}} + \text{C}_{4\text{Ar}}$), 133.2 ($\text{C}_{6\text{Ar}}$), 128.9; 128.2 (2C, $\text{C}_{2\text{Ar}} + \text{C}_{5\text{Ar}}$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 184.9736$, found 184.9740.

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹⁵⁶

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]benzoic acid **II-91**



II-91

NaH (60% in mineral oil, 386 mg, 9.6 mmol, 6 eq.) was suspended in degassed anhydrous THF (5 mL) in a Schlenk tube. 2,5-Dimercaptobenzoic acid **II-90** (300 mg, 1.61 mmol) previously

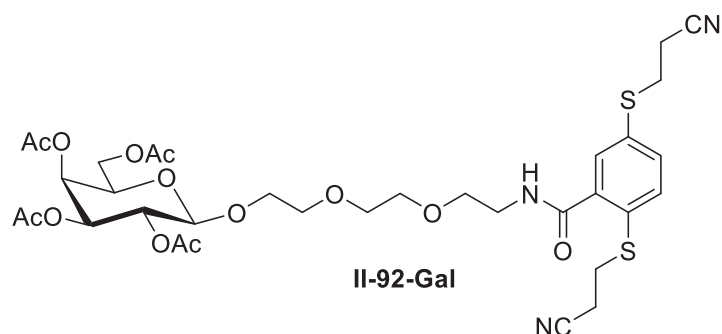
dissolved in degassed and hot THF (10 mL) was added. The mixture was stirred at r.t. during 1 h then 3-bromopropionitrile (1.34 mL, 16.1 mmol, 10 eq.) was added dropwise at r.t. The mixture was heated to reflux during 24 h. The solvent was evaporated off and the yellow solid crude residue was suspended in CHCl₃ (30 mL) then filtered off using a hydrophobic membrane (5 µm). The solid was dried under vacuum then suspended in 2M HCl (30 mL) and sonicated. The precipitate was filtered off using a hydrophilic membrane (5 µm) and washed with water (5×20 mL). The solid was dried under vacuum to afford 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]benzoic acid **II-91** (374 mg, 80%) as a bright yellow amorphous solid.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 8.00 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.60 (dd, *J* = 2.2; 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 3.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, SCH₂), 3.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, SCH₂), 2.82 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CN), 2.73 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂CN).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 168.9 (CO₂H), 139.3, 135.8; 134.6; 128.7 (3C, CH_{Ar}) 132.2, 131.7, 119.6; 119.5 (2C, CN), 30.9; 27.8 (2C, SCH₂), 18.8; 17.9 (2C, CH₂CN).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₁₃H₁₂N₂NaO₂S₂ : [M+Na]⁺ = 315.0232, found 315.0230.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-92-Gal**



Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]benzoic acid **II-91** (444 mg), HCTU (629 mg), *i*Pr₂NEt (1.38 mL) and ammonium **II-78-Gal** (902 mg) affording the desired benzamide **II-92-Gal** (668 mg, 58%) as a colorless oil.

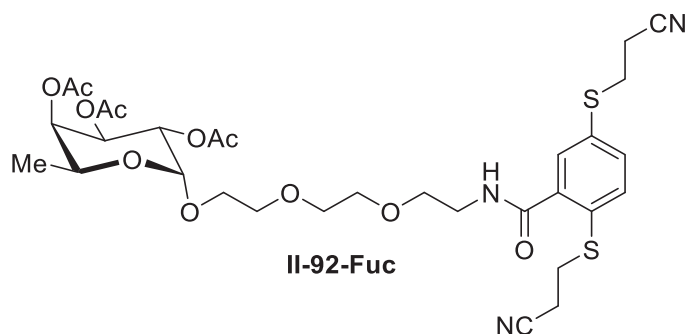
*R*_f = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{6Ar}), 7.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{3Ar}), 7.39 (dd, *J* = 2.1; 8.2 Hz, 1H, H_{4Ar}), 6.97 (bs, 1H, NH), 5.36 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H_{4Gal}), 5.15 (dd, *J* = 8.0; 10.5 Hz, 1H, H_{2Gal}), 4.99 (dd, *J* = 3.4, 10.5 Hz, 1H, H_{3Gal}), 4.49 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{1Gal}), 4.14 (dd, *J* = 7.0, 11.3 Hz, 1H, H_{6Gal}), 4.08 (dd, *J* = 7.0, 11.3 Hz, 1H, H_{6'Gal}), 3.93-3.87 (m, 2H, H_{5Gal} + CH₂OGal), 3.70-3.55 (m, 11H, 4×CH₂O + NCH₂ + CH₂OGal), 3.16 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, SCH₂), 3.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, SCH₂), 2.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CN), 2.61 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CN), 2.13; 2.02; 1.94 (3s, 4×3H, COCH₃).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): 170.5; 170.3; 170.2; 169.6 ($4\times\text{C}$, COCH_3), 167.2 (CONH), 140.1 (C_{ArS}), 134.4 (C_{ArCONH}), 133.7 ($\text{C}_{4\text{Ar}}$), 132.3 ($\text{C}_{3\text{Ar}}$), 130.5 ($\text{C}_{6\text{Ar}}$), 130.4 (C_{ArS}), 118.0; 117.8 (2C , CN), 101.4 ($\text{C}_{1\text{Gal}}$), 70.9 ($\text{C}_{3\text{Gal}}$), 70.75 ($\text{C}_{5\text{Gal}}$), 70.73; 70.4; 70.3; 69.6 ($4\times\text{C}$, CH_2O), 69.2 (CH_2OGal), 68.9 ($\text{C}_{2\text{Gal}}$), 67.1 ($\text{C}_{4\text{Gal}}$), 61.3 ($\text{C}_{6\text{Gal}}$), 40.0 (NCH_2), 30.8; 29.7 (2C , SCH_2), 20.9; 20.79; 20.77; 20.6 (4C , COCH_3), 18.5; 18.2 (2C , CH_2CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{NaO}_{13}\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 776.2130$, found 776.2093.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-92-Fuc**



Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]benzoic acid **II-91** (338 mg), HCTU (479 mg), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (1 mL) and ammonium **II-78-Fuc** (621 mg) affording the desired benzamide **II-92-Fuc** (100 mg, 12%) as a colorless oil.

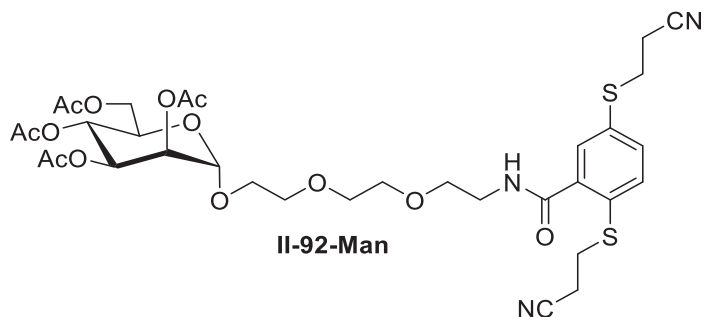
$R_f = 0.60$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): 7.56 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{Ar}}$), 7.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{Ar}}$), 7.38 (dd, $J = 1.7$; 8.2 Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{Ar}}$), 7.01 (bs, 1H, NH), 5.33-5.30 (m, 1H, $\text{H}_{2\text{Fuc}}$), 5.24 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{Fuc}}$), 5.07-5.03 (m, 2H, $\text{H}_{1\text{Fuc}} + \text{H}_{3\text{Fuc}}$), 4.17 (q, $J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{Fuc}}$), 3.75-3.70 (m, 1H, CH_2OFuc), 3.68-3.55 (m, 12H, $4\times\text{CH}_2\text{O} + \text{NCH}_2 + \text{CH}_2\text{OFuc}$), 3.15 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, SCH_2), 3.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, SCH_2), 2.63 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2CN), 2.60 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2CN), 2.13; 2.02; 1.94 ($3\times 3\text{H}$, COCH_3), 1.10 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, $\text{H}_{6\text{Fuc}}$).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): 170.5; 170.4; 170.1 (3C , COCH_3), 167.1 (CONH), 140.0 (C_{ArS}), 134.2 (C_{ArCONH}), 133.4 ($\text{CH}_{4\text{Ar}}$), 132.0 ($\text{CH}_{3\text{Ar}}$), 130.28 (C_{ArS}), 130.22 ($\text{CH}_{6\text{Ar}}$), 117.8; 117.6 (2C , CN), 96.1 ($\text{C}_{1\text{Fuc}}$), 71.0 ($\text{C}_{4\text{Fuc}}$), 70.6; 70.3; 70.0; 69.5 (4C , CH_2O), 68.1 ($\text{C}_{3\text{Fuc}}$), 67.8 ($\text{C}_{2\text{Fuc}}$), 67.1 (CH_2OFuc), 64.2 ($\text{C}_{5\text{Fuc}}$), 39.8 (NCH_2), 30.6; 29.5 (2C , SCH_3), 20.7; 20.6; 20.5 (3C , COCH_3) 18.3; 18.0 (2C , CH_2CN), 15.8 ($\text{C}_{6\text{Fuc}}$)

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{NaO}_{11}\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 718.2075$, found 718.2047.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-92-Man**



Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]benzoic acid **II-91** (655 mg), HCTU (927 mg), *i*Pr₂NEt (1.98 mL) and ammonium **II-78-Man** (1.33 g) affording the desired benzamide **II-92-Man** (980 mg, 58%) as a colorless oil.

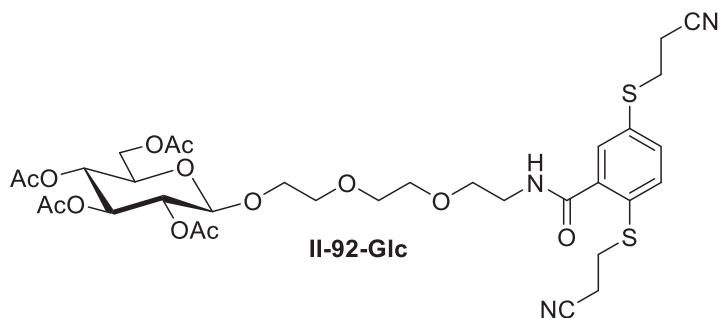
R_f = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.60 (s, 1H, H_{Ar}), 7.47-7.38 (m, 2H, H_{Ar}), 6.99 (bs, 1H, NH), 5.34-5.26 (m, 2H, H₃ + H₄), 5.23 (bs, 1H, H₂), 4.86 (s, 1H, H₁), 4.25 (dd, *J* = 4.8; 12.3 Hz, 1H, H₆), 4.09 (dd, *J* = 1.6; 12.3 Hz, 1H, H_{6'}), 4.05-4.00 (m, 1H, H₅), 3.80-3.75 (m, 1H, CH₂OMan), 3.73-3.60 (m, 11H, 4×CH₂O + NCH₂ + CH₂OMan), 3.20-3.10 (m, 2×2H, SCH₂), 2.69-2.59 (m, 2×2H, CH₂CN), 2.13; 2.08; 2.03; 1.96 (4×3H, COCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 170.8; 170.2; 170.1; 169.8 (4×C, COCH₃), 167.3 (CONH), 140.3 (C_{Ar}S), 134.5 (C_{Ar}CONH), 133.9; 132.3; 130.5 (3C, CH_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}S), 118.0; 117.8 (CH₂CN), 97.8 (C₁), 70.8; 70.5; 70.1; 69.7 (4C, CH₂O), 69.6 (C₂), 69.2 (C₃ or C₄), 68.6 (C₅), 67.4 (CH₂OMan), 66.2 (C₃ or C₄), 62.5 (C₆), 40.1 (NCH₂), 31.0; 29.8 (2C, SCH₂), 21.0; 20.9; 20.88; 20.84 (4C, COCH₃), 18.7; 18.3 (2C, CH₂CN)

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z* : calcd. for C₃₃H₄₃N₃NaO₁₃S₂ : [M+Na]⁺ = 776.2130, found 776.2107.

2,5-Di[(2-cyanoethyl)thio]-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-92-Glc**



Prepared according to the general procedure **A** from 2,5-di[(2-cyanoethyl)thio]benzoic acid **II-91** (53 mg), HOBT·H₂O (36 mg), EDCI (42 μL), *i*Pr₂NEt (158 μL) and ammonium **II-78-Glc** (107 mg) affording the desired benzamide **II-92-Glc** (62 mg, 45%) as a colorless oil.

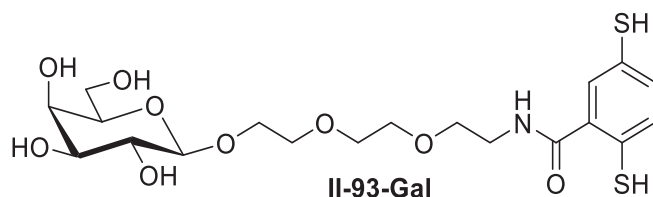
$R_f = 0.60$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): 7.59 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{Ar}}$), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{Ar}}$), 7.40 (dd, $J = 1.8$; 8.1 Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{Ar}}$), 7.02 (bs, 1H, NH), 5.18 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{Glc}}$), 5.15 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{Glc}}$), 4.99 (dd, $J = J' = 8.0$; 9.5 Hz, 1H, $\text{H}_{2\text{Glc}}$), 4.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\text{Glc}}$), 4.24 (dd, $J = 4.7$, 12.3 Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{Glc}}$), 4.12 (dd, $J = 2.3$; 12.3 Hz, 1H, $\text{H}_{6'\text{Glc}}$), 3.93-3.87 (dt, $J = 4.3$; 10.8 Hz, 1H, CH_2OGlc), 3.70-3.57 (m, 12H, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{NCH}_2 + \text{CH}_2\text{OGlc} + \text{H}_{5\text{Glc}}$), 3.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, SCH_2), 3.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, SCH_2), 2.66 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2CN), 2.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2CN), 2.07; 2.02; 2.01; 1.99 ($4 \times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.4; 169.5 (3s, $4 \times \text{C}$, COCH_3), 167.3 (CONH), 140.3 (C_{ArS}), 134.5 (C_{ArCONH}), 133.8 ($\text{CH}_{4\text{Ar}}$), 132.3 ($\text{CH}_{3\text{Ar}}$), 130.49 (s, 2C, $\text{CH}_{6\text{Ar}} + \text{C}_{\text{ArS}}$), 118.0; 117.8 (2C, CN), 100.9 ($\text{C}_{1\text{Glc}}$), 72.8 ($\text{C}_{3\text{Glc}}$), 71.9 ($\text{C}_{5\text{Glc}}$), 71.3 ($\text{C}_{4\text{Glc}}$), 70.7; 70.4; 70.2; 69.7 (4C, CH_2O), 69.3 (CH_2OGlc), 68.5 ($\text{C}_{4\text{Glc}}$), 62.1 ($\text{C}_{6\text{Glc}}$), 40.0 (NCH_2), 30.9, 29.73, (2C, SCH_2), 20.9; 20.8; 20.76; 20.73 (4C, COCH_3), 18.5; 18.2 (2C, CH_2CN).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{NaO}_{13}\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 776.2130$, found 776.2107.

2,5-Dimercapto-*N*-[3,6-dioxa-8-(β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-93-Gal** (**Yg**)



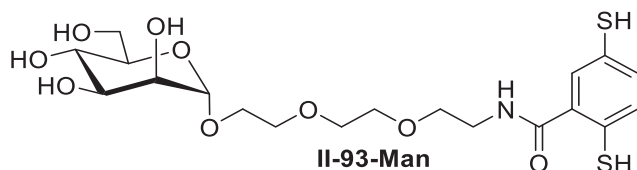
Prepared according to the general procedure **B** from protected dithiophenol **II-92-Gal** (668 mg) and $\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.38 g, 16 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-93-Gal** (380 mg, 89%) as a white foam.

ϵTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

^1H NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \epsilon\text{TFA}$): 7.42 (d, $J = 0.6$; 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.34-7.30 (m, 2H, H_{Ar}), 4.33 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_1), 4.05-3.97 (m, 2H, CH_2OGlc), 3.89 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H_4), 3.80-3.70 (m, 12H, $\text{H}_6 + \text{NCH}_2 + 4 \times \text{CH}_2\text{O}$), 3.65-3.55 (m, 4H, $\text{H}_3 + \text{H}_5$), 3.47 (dd, $J = 7.7$; 9.9 Hz, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \epsilon\text{TFA}$): 170.5 (CONH), 134.3, 131.7; 131.5; 128.2 (3C, CH_{Ar}), 128.4, 127.5, 102.8 (C_1), 75.1 (C_4), 72.7 (C_3), 70.7 (C_2), 69.7; 69.6; 69.4; 68.7; 68.6 (5C, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGlc}$), 68.5 (C_4), 60.9 (C_6), 39.4 (NCH_2).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NNaO}_9\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 502.1176$, found 502.1176.

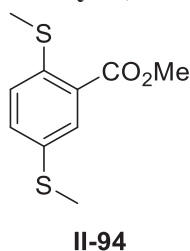
2,5-Dimercapto-*N*-[3,6-dioxa-8-(α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide II-93-Man (Y_M)


Prepared according to the general procedure **B** from protected dithiophenol **II-92-Man** (520 mg) and CsOH·H₂O (2.32 g, 16 eq.) affording the desired unprotected dithiophenol **II-93-Man** (130 mg, 40%) as a white foam.

εTFA was added to avoid oligomerisation during NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ + εTFA): 7.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.29 (d, *J* = 2.0; 8.2 Hz, 1H, H_{Ar}), (dd, *J* = Hz, 1H, H_{Ar}), 4.63 (s, 1H, H₁), 3.70-3.30 (m, 18H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + NCH₂ + 4×CH₂O + CH₂OMan).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆ + εTFA): 167.3, (CONH), 134.1, 131.0; 130.5; 128.1 (3C, CH_{Ar}), 129.3, 128.2, 100.0 (C₁), 74.0; 71.0; 70.3; 67.0 (C₂ + C₃ + C₄ C₅), 69.8; 69.58; 69.55; 68.75 (4C, CH₂O), 65.7 (CH₂OMan), 61.3 (C₆), 39.04 (NCH₂).

Methyl 2,5-di(methylthio)benzoate II-94


In a schlenck, KOH (3 g, 53.7 mmol, 5 eq.) was dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry degassed DMSO (20 mL) and stirred at r.t. After 30 min, a solution of 2,5-dimercaptobenzoic acid **II-90** (2 g, 10.7 mmol) in dry degassed DMSO (40 mL) was added. After 15 min, iodomethane (6.7 mL, 107 mmol, 10 eq.) was added dropwise and the yellow mixture was stirred at r.t. during 19 h. The reaction was quenched with ice (60 g) and water (60 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3×75 mL). The organic layers were combined, washed with brine (6×200 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (Cyclohexane/EtOAc 85:15) affording methyl 2,5-di(methylthio)benzoate **II-94** (1.21 g, 49%) as a yellow amorphous solid.

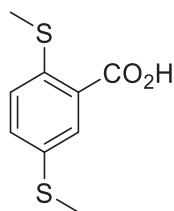
*R*_f = 0.40 (Cyclohexane/EtOAc 85:15)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.31 (dd, *J* = 2.3; 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.86 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.49; 2.42 (2s, 2×3H, SCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 166.3 (C=O₂CH₃), 139.9, 133.6, 131.2; 129.5; 125.0 (3C, CH_{Ar}), 127.2, 52.1 (CO₂CH₃) 16.3; 15.6 (2C, SCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $C_{10}H_{12}NaO_2S_2$: $[M+Na]^+ = 251.01709$, found 251.0170.

2,5-Di(methylthio)benzoic acid **II-95**



II-95

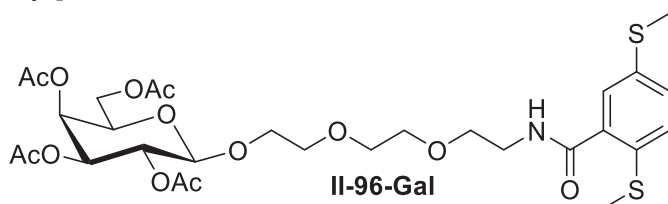
Methyl 2,5-di(methylthio)benzoate **II-94** (1 g, 4.38 mmol) was suspended in a solution of 1.3M KOH (30 mL, EtOH/H₂O, 1:1 v/v). The mixture was heated to reflux during 16 h. After cooling, conc. HCl was added to reach pH 1 and the resulting solution was evaporated. The residue was suspended in 1M HCl (20 mL), filtered and washed with water (4×15 mL). The resulting precipitate was dried under vacuum affording 2,5-di(methylthio)benzoic acid **II-95** (910 mg, > 95%) as a beige amorphous solid.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 7.86 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.44 (dd, $J = 2.3$; 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.21 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 2.49; 2.42 (2×3H, SCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): 169.3 (CO₂H), 141.3; 135.3 (C_{Ar}S), 132.3 (C_{Ar}CO₂H), 130.7; 129.2; 126.4 (2C, CH_{Ar}), 16.2; 15.6 (2C, SCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $C_9H_{10}NaO_2S_2$: $[M+Na]^+ = 237.0014$, found 237.0014.

2,5-Di(methylthio)-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-96-Gal**



Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di(methylthio)benzoic acid **II-95** (238 mg), HCTU (459 mg), *i*Pr₂NEt (966 μL) and ammonium **II-78-Gal** (594 mg) affording the desired benzamide **II-96-Gal** (85 mg, 12%) as a colorless oil.

$R_f = 0.60$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

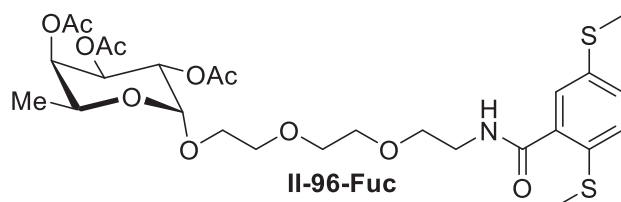
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.44 (bs, 1H, H_{Ar}), 7.24-7.21 (m, 2H, H_{Ar}), 7.00 (bs, 1H, NH), 5.35 (dd, $J = 0.9$; 3.4 Hz, 1H, H₄), 5.16 (dd, $J = 8.0$; 10.4 Hz, 1H, H₂), 4.97 (dd, $J = 3.4$; 10.4 Hz, 1H, H₃), 4.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁), 4.16-4.04 (m, 1H, H₆), 3.95-3.94 (m, 2H, H₅ +

CH_2OGal), 3.67-3.55 (m, 11H, $4\times\text{CH}_2\text{O} + \text{NCH}_2 + \text{CH}_2\text{OGal}$), 2.45; 2.41 (2s, $2\times 3\text{H}$, SCH_3), 2.12; 2.01; 1.95 (3s, $4\times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): 170.5; 170.3; 170.2; 169.5 ($4\times\text{C}$, COCH_3), 167.7 (CONH), 136.3, 136.2, 133.1, 128.9; 128.8; 126.7 (3C, CH_{ar}), 101.3 (C_1), 70.9 (C_3), 70.68; 70.3; 70.2; 69.7 (4C, CH_2O), 70.64 (C_5), 69.1 (CH_2OGal), 68.8 (C_2), 67.0 (C_4), 61.2 (C_6), 39.7 (NCH_2), 20.8; 20.67; 20.66; 20.5 (4C, COCH_3), 17.3; 16.0 (2C, SCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NNaO}_{13}\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 698.1912$, found 698.1912.

2,5-Di(methylthio)-*N*-[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-96-Fuc**



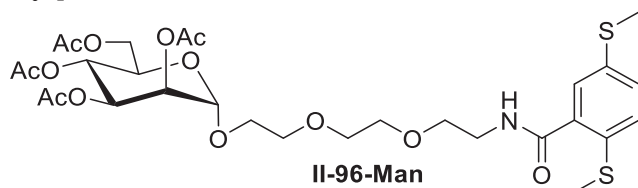
Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di(methylthio)benzoic acid **II-95** (160 mg), HCTU (309 mg), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (650 μL) and ammonium **II-78-Fuc** (444 mg) affording the desired benzamide **II-96-Fuc** (77 mg, 15%) as a colorless oil.

$R_f = 0.60$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.43 (bs, 1H, H_{Ar}), 7.23-7.20 (m, 2H, H_{Ar}), 7.02 (bs, 1H, NH), 5.35-5.27 (m, 1H, H_2 or H_4), 5.26-5.23 (dd, $J = 1.3$; 3.3 Hz, 1H, H_2 or H_4), 5.09-5.04 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_3$), 4.16 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_5), 3.75-3.69 (m, 1H, CH_2OFuc), 3.68-3.54 (m, 11H, $4\times\text{CH}_2\text{O} + \text{NCH}_2 + \text{CH}_2\text{OFuc}$), 2.45; 2.41 (2s, $2\times 3\text{H}$, SCH_3), 2.13; 2.02; 1.94 (3s, $4\times 3\text{H}$, COCH_3), 1.09 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H_6)

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): 170.7; 170.5; 170.2 ($3\times\text{C}$, COCH_3), 167.7 (CONH), 136.23, 136.20, 133.1, 128.8; 128.7; 126.7 (3C, CH_{ar}), 96.3 (C_1), 71.2; 68.0 (2C, $\text{C}_2 + \text{C}_4$), 70.7; 70.4; 70.2; 69.8 (4C, CH_2O), 68.2 (C_3), 67.3 (CH_2OFuc), 64.3 (C_5), 39.8 (NCH_2), 20.9; 20.76; 20.71 (3C, COCH_3), 17.3; 16.1 (2C, SCH_3), 15.9 (C_6).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{NNaO}_{11}\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 640.1857$, found 640.1853.

2,5-Di(methylthio)-N-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-96-Man**


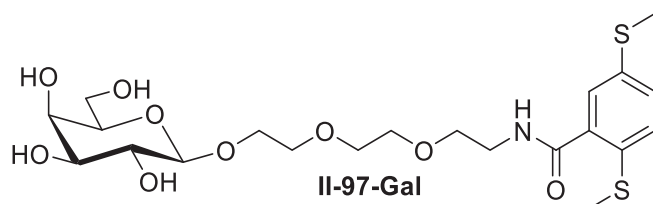
Prepared according to the general procedure **G** from 2,5-di(methylthio)benzoic acid **II-95** (196 mg), HCTU (378 mg), *i*Pr₂NEt (795 μ L) and ammonium **II-78-Man** (542 mg) affording the desired benzamide **II-96-Man** (153 mg, 23%) as a colorless oil.

R_f = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.40 (s, 1H, H_{Ar}), 7.21-7.18 (m, 2H, H_{Ar}), 7.02 (bs, 1H, NH), 5.32-5.218 (m, 3H, H₂ + H₃ + H₄), 4.81 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H₁), 4.22 (dd, J = 4.9; 12.2 Hz, 1H, H₆), 4.07-3.97 (m, 2H, H₅ + H_{6'}), 3.76-3.70 (m, 1H, $\underline{\text{CH}_2\text{OMan}}$), 3.67-3.55 (m, 11H, 4 $\times$ CH₂O + NCH₂ + $\underline{\text{CH}_2\text{OMan}}$), 2.42; 2.39 (2s, 2 $\times$ 3H, SCH₃), 2.10; 2.04; 1.99; 1.93 (4 $\times$ 3H, COCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 170.7; 170.1; 170.0; 169.7 (4 $\times$ C, $\underline{\text{COCH}_3}$), 167.7 (CONH), 136.1 (s, 2C), 133.1, 128.8; 128.6; 126.7 (3C, CH_{Ar}), 97.7 (C₁), 70.7; 70.3; 70.0; 69.7 (4C, CH₂O), 69.6; 69.1; 66.1 (3C, C₂ + C₃ + C₄), 68.4 (C₅), 67.3 ($\underline{\text{CH}_2\text{OMan}}$), 62.4 (C₆), 39.8 (NCH₂), 20.9; 20.74; 20.71; 20.6 (4C, $\underline{\text{COCH}_3}$), 17.3; 16.0 (2C, SCH₃)

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₂₉H₄₁NNaO₁₃S₂ : [M+Na]⁺ = 698.1912, found 698.1945.

2,5-Di(methylthio)-N-[3,6-dioxa-8-(β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide **II-97-Gal**


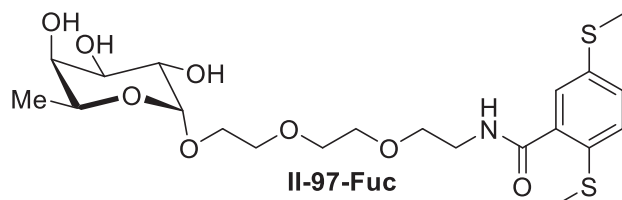
Prepared according to the general procedure **B** from peracetylated galactoside **II-96-Gal** (77 mg) and CsOH $\cdot$ H₂O (154 mg, 8 eq.) affording the desired galactoside **II-97-Gal** (36 mg, 61%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): 7.35-7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31-7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 5.35 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H₁), 3.86-3.79 (m, 3H, H₂ + H₆ + $\underline{\text{CH}_2\text{OGal}}$) 3.70-3.52 (m, 15H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6'} + 4 $\times$ CH₂O + NCH₂ + $\underline{\text{CH}_2\text{OGal}}$), 2.49; 2.44 (2s, 2 $\times$ 3H, SCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 171.0 (CONH), 137.9, 137.2, 134.9, 129.7; 129.2; 126.8 (3C, CH_{Ar}), 101.7 (C₁), 74.3, 72.3, 71.8, 68.3 (4C, C₂ + C₃ + C₄ + C₅), 71.3; 71.09; 71.02; 70.2 (4C, CH₂O), 67.3 ($\underline{\text{CH}_2\text{OGal}}$), 62.7 (C₆), 40.6 (NCH₂), 16.6; 15.6 (2C, SCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $C_{21}H_{33}NNaO_9S_2$: $[M+Na]^+ = 530.1489$, found 530.1485.

2,5-Di(methylthio)-*N*-[3,6-dioxa-8-(α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide II-97-Fuc



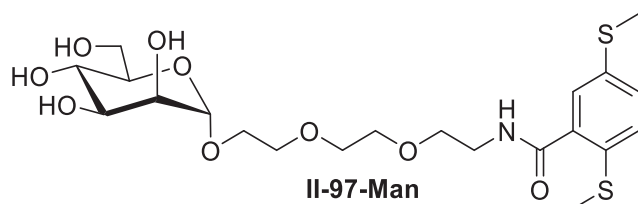
Prepared according to the general procedure **B** from peracetylated fucoside **II-96-Fuc** (85 mg) and $CsOH \cdot H_2O$ (186 mg, 8 eq.) affording the desired fucoside **II-97-Fuc** (36 mg, 54%) as a colorless oil.

1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.35-7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31-7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 4.75 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H_1), 3.97 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_5), 3.81-3.63 (m, 12H, $H_2 + H_3 + H_4 + 4 \times CH_2O + CH_2OFuc$), 3.61-3.51 (m, 3H, $NCH_2 + CH_2OFuc$), 2.49; 2.44 (2s, $2 \times 3H$, SCH_3), 1.19 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 171.0 (CONH), 137.9, 137.2, 134.9, 129.7; 129.2; 126.8 (3C, CH_{Ar}), 100.7 (C_1), 73.6, 71.7, 70.1, 67.6 (4C, $C_2 + C_3 + C_4 + C_5$), 71.7; 71.6; 71.3; 71.2 (4C, CH_2O), 68.2 (CH_2OMan), 40.8 (NCH_2), 16.8; 15.9 (2C, SCH_3), 16.7 (C_6).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $C_{21}H_{33}NNaO_8S_2$: $[M+Na]^+ = 514.1540$, found 514.1538.

2,5-Di(methylthiol)-*N*-[3,6-dioxa-8-(α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]benzamide II-97-Man



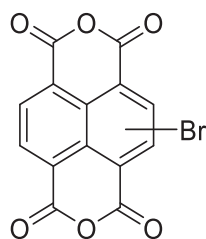
Prepared according to the general procedure **B** from peracetylated mannoside **II-96-Man** (153 mg) and $CsOH \cdot H_2O$ (368 mg, 8 eq.) affording the desired mannoside **II-97-Man** (46 mg, 30%) as a colorless oil.

1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.35-7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31-7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 4.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_1), 4.02-3.95 (m, 1H, CH_2OMan), 3.81 (dd, $J = 1.0$; 3.4 Hz, 1H, H_3 or H_4), 3.77-3.64 (m, 11H, $4 \times CH_2O + H_6 + CH_2OMan$), 3.57-3.40 [m, 5H, $H_2 + H_5 + NCH_2 + (H_3$ or $H_4)$], 2.49; 2.44 (2s, $2 \times 3H$, SCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 171.0 (CONH), 137.9, 137.2, 134.9, 129.7; 129.2; 126.8 (3C , CH_{Ar}), 105.1 (C_1), 76.7, 74.8, 72.5, 70.2 (4C , $\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4 + \text{C}_5$), 71.21; 71.19; 70.9; 70.2 (4C , CH_2O), 69.2 (CH_2OMan), 62.2 (C_6), 40.5 (NCH_2), 16.6; 15.6 (2C , SCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NNaO}_9\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 530.1489$, found 530.1492.

(Poly)bromo naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic dianhydride II-99

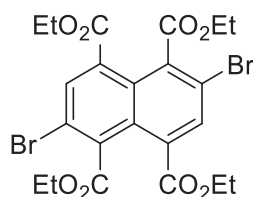


II-99

Naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic dianhydride **II-98** (5 g, 18.6 mmol) was dissolved in oleum (20-30% free SO_3 , 125 mL) under inert atmosphere (Ar). The brownish mixture was heated at 50°C . After 30 min, Br_2 (4.8 mL, 93.2 mmol, 5 eq.) was added dropwise. I_2 (25 mg, cat) was added and the reaction was heated at 100°C during 24 h. After cooling, the reaction was quenched by slow addition (Pasteur pipette) of the crude product to ice (600 g) affording a yellow precipitate which was extensively washed with water until neutral pH of the filtrate. The yellow solid was dried under vacuum to afford a mixture of mono, di, tri and tetra-Br naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic dianhydride **II-99** (8.2 g) as a yellow amorphous solid.

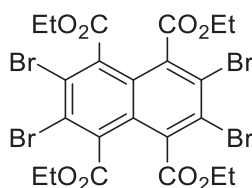
Tetraethyl 2,6-dibromonaphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-100 and

Tetraethyl 2,3,6,7-tetrabromonaphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-114



II-100

and



II-114

A mixture of (poly)bromo naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic dianhydride **II-99** (8.2 g) was dissolved in EtOH (106 mL). K_2CO_3 (16.3 g, 118 mmol) was added and the reaction was placed under inert atmosphere (Ar). Iodoethane (81.5 mL, 1.02 mol) was slowly added and the mixture was heated to reflux during 21 h. After cooling, CH_2Cl_2 (600 mL) was added and washed with water (2×120 mL). The organic layer was dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The crude residue was purified by several successive flash silica gel column chromatography (CH_2Cl_2) affording dibromo **II-100** (2.18 g, 20 % over two steps) as a colorless solid.

$R_f = 0.40$ (CH_2Cl_2)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.08 (s, 2H, H_{Ar}), 4.39 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H, CH_2), 4.37 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H, CH_2), 1.42 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, CH_3), 1.41 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, CH_3).

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹⁵¹

Another compound was obtained from the flash silica gel column chromatography tetrabromo **II-114** (2.84 g, 21% over two steps) as a white amorphous solid.

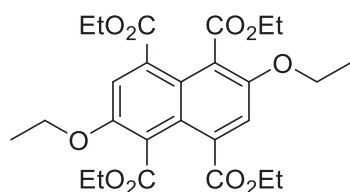
$R_f = 0.80$ (CH_2Cl_2)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 4.39 (q, $J = 7.2$ Hz, 8H, CH_2), 1.39 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 165.8 (s, 4C, CO_2CH_2), 135.2; 125.8; 125.1 (3s, 10C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{Br} + \text{C}_{\text{Ar}}\text{CO}_2 + \text{C}_{\text{Ar}4\text{a}} + \text{C}_{\text{Ar}8\text{a}}$), 63.3 (s, 4C, CH_2), 13.6 (s, 4C, CH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Br}_4\text{NaO}_8$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 750.7784$, found 750.7796.

Tetraethyl 2,6-diethoxynaphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester **II-101**



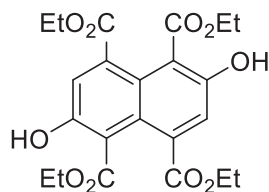
II-101

Dibromo **II-100** (500 mg, 0.870 mmol) dissolved in dry DMF (10 mL) was added dropwise to a freshly prepared solution of NaOEt (2M in EtOH , 17 mL, 34 mmol, 39 eq.). The resulting yellow mixture was heated at 45°C during 14 h. The reaction was quenched with H_2O (10 mL) and then evaporated to dryness. The crude residue was dissolved in water (50 mL) and extracted with EtOAc (3×50 mL). The organic layers were combined, dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (cyclohexane/ EtOAc 80:20) to afford diethoxy **II-101** (180 mg, 41%) as a yellow amorphous solid.

$R_f = 0.40$ (cyclohexane/ EtOAc 80:20)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.65 (s, 2H, H_{Ar}), 4.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 8H, CO_2CH_2), 4.22 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H, OCH_2CH_3), 1.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, OCH_2CH_3), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹⁵¹

Tetraethyl 2,6-dihydroxynaphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-102**II-102**

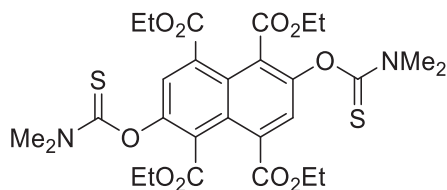
Diethoxy **II-101** (180 mg, 0.357 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL). BBr₃ (1M in CH₂Cl₂, 1.07 mL, 1.07 mmol, 3 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred at r.t. during 25 min. H₂O (10 mL) was added and the resulting biphasic mixture was stirred vigorously during 20 min. CH₂Cl₂ (150 mL) was added and the organic layer was washed with saturated NaHCO₃ (50 mL) and brine (50 mL), (Na₂SO₄), filtered and evaporated affording hydronaphthoquinone **II-102** (116 mg, 72%) as a yellow amorphous solid.

R_f = 0.70 (cyclohexane/EtOAc 80:20)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 10.13 (s, OH, 2H), 7.74 (s, H_{Ar}, 2H), 4.32 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CH₂), 4.30 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CH₂), 1.36 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH₃), 1.29 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.7; 167.6 (2s, 4C, CO₂), 157.4 (s, 2C, C_{Ar}OH), 135.1 (s, 2C), 125.1 (s, 2C), 123.9 (C_{Ar}H), 111.0 (s, 2C), 62.2; 61.9 (2s, 4C, CH₂), 14.2; 13.8 (2s, 4C, CH₃).

ESI-MS (positive mode) m/z : [M+H]⁺ = 449.5

Tetraethyl 2,6-di[(*N,N'*-dimethylthiocarbamoyl)oxy]naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-103**II-103**

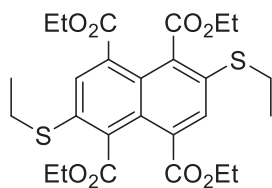
Hydronaphthoquinone **II-102** (50 mg, 0.111 mmol) was dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry DMA (4 mL). DABCO (50 mg, 0.446 mmol, 4 eq.) and *N,N*-dimethylthiocarbamoyl chloride (55 mg, 0.446 mmol, 4 eq.) dissolved in dry DMA (4 mL) were added and the resulting orange mixture was stirred at r.t. during 38 h. NaH (60% in mineral oil, 16 mg, 0.67 mmol, 6 eq.), *N,N*-dimethylthiocarbamoyl chloride (82 mg, 0.669 mmol, 6 eq.) and dry DMA (3 mL) were added and the solution was stirred for an additional 24 h. The reaction was quenched with water (10 mL) and the formation of a precipitate was observed. The solid was filtered off and washed with water (20 mL). After drying, it was washed again with cyclohexane to afford the di-*O*-thiocarbamate **II-103** (30 mg, 43%) as a yellow amorphous solid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.79 (s, H_{Ar} , 2H), 4.33 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH_2), 4.25 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH_2), 3.44 (s, 6H, NMe_2), 3.38 (s, 6H, NMe_2), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_3), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 186.2 (s, 2C, $\text{C}=\text{S}$), 167.0; 164.5 (2s, 4C, CO_2CH_2), 150.4 (s, 2C, C_{ArO}), 133.7 (s, 2C), 128.4 (s, 2C), 128.1 (CH_{Ar}), 125.8 (s, 2C), 62.0; 61.8 (2s, 4C, CH_2), 43.4; 39.1 (2s, 4C, NMe_2), 14.2; 14.0 (2s, 4C, CH_2CH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{NaO}_{10}\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 645.1547$, found 645.1546.

Tetraethyl 2,6-di(ethylthio)naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic ester II-104



II-104

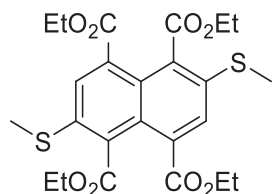
Dibromo **II-100** (100 mg, 0.174 mmol), K_2CO_3 (481 mg, 3.48 mmol, 20 eq.) and 18-crown-6 (4.5 mg, 0.174 mmol, 0.1 eq.) were introduced in a microwave vial. CHCl_3 (5 mL) then ethanethiol (1.25 mL, 17.4 mmol, 100 eq.) were added. The vial was sealed and heated at 85°C during 48 h. After cooling, cyclohexane (50 mL) was added and washed with water (3×50 mL). The organic layer was dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$ 4:1 then CH_2Cl_2) affording di(ethylthio) **II-104** as a bright yellow amorphous solid (85 mg, 91%).

$R_f = 0.40$ (PE/EtOAc 4:1)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.89 (s, 2H, H_{Ar}), 4.35 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CO_2CH_2), 4.34 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CO_2CH_2), 3.04 (q, $J = 7.3$ Hz, 4H, SCH_2), 1.42-1.30 (m, 18H, SCH_2CH_3 + $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

^1H NMR data was in agreement with the literature.¹⁵¹

Tetraethyl 2,6-di(methylthio)naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-105



II-105

Dibromo **II-100** (50 mg, 0.087 mmol), sodium thiomethoxide (610 mg, 8.7 mmol, 100 eq.) and 18-crown-6 (23 mg, 0.087 mmol, 1 eq.) were introduced in a microwave vial with CHCl_3 (2.5 mL) and dry DMF (2.5 mL). The vial was sealed and heated at 85°C during 48 h. After cooling, cyclohexane (50 mL) was added and washed with water (5×50 mL). The organic layer was

dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ then CH₂Cl₂/MeOH 99:1) affording di(methylthio) **II-105** as a bright yellow amorphous solid (31 mg, 70%).

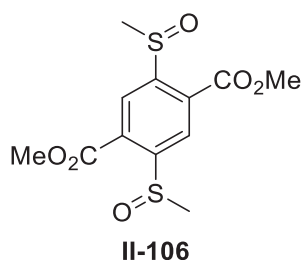
$R_f = 0.20$ (CH₂Cl₂)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.88 (s, 2H, H_{Ar}), 4.35 (q, $J = 7.2$ Hz, 8H, CH₂), 2.56 (s, 6H, SCH₃) 1.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 167.7; 166.8 (2s, 4C, CO₂CH₂), 138.9 (s, 2C), 132.0 (s, 2C), 130.0 (s, 2C), 128.0 (s, 2C, CH_{Ar}), 127.1 (s, 2C), 62.0; 61.8 (2s, 4C, CO₂CH₂), 16.8 (s, 2C, SCH₃), 14.2; 14.1 (2s, 4C, CH₂CH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₂₄H₂₈NaO₈S₂ : [M+Na]⁺ = 531.1118, found 531.1093.

Methyl 2,5-Di(methylsulfinyl)terephthalate **II-106**

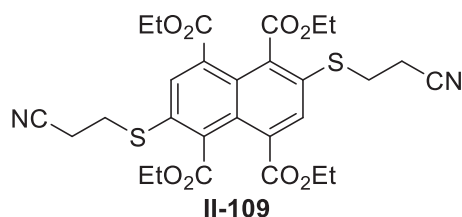


Methyl 2,5-Di(methylthio)terephthalate **II-81** (51 mg, 0.178 mmol) was dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) before being cooled at 0°C via an ice bath. *m*-CPBA (<77%, 86 mg, 0.374 mmol, 2.1 eq.) was added by portions. The ice bath was removed and the resulting red solution was stirred at r.t. during 2 h. CH₂Cl₂ (35 mL) was added and washed with satd Na₂SO₃ (20 mL), satd NaHCO₃ (2×20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and evaporated affording methyl 2,5-di(methylsulfinyl)terephthalate **II-106** (54 mg, 96%) as a yellow amorphous solid

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.93; 8.92 (2s, 2H, H_{Ar}), 3.99 (s, 6H, CO₂CH₃), 2.90 (s, 6H, SCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 164.7 (s, 2C, CO₂CH₃), 153.8; 153.7 (2C, C_{Ar}S), 131.2 (s, 2C, C_{Ar}CO₂), 127.5 (s, 2C, CH_{Ar}), 53.4 (s, 2C, CO₂CH₃), 44.14; 44.09 (2C, SOCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₁₂H₁₄NaO₆S₂ : [M+Na]⁺ = 341.0124, found 341.0128.

Tetraethyl 2,6-di[(2-cyanoethyl)thio]naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-109

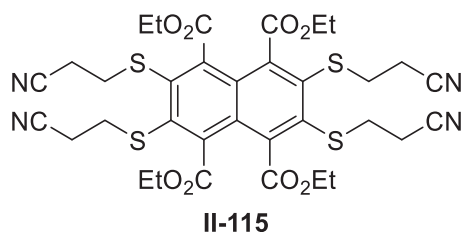
Dibromo **II-100** (1.17 g, 2.04 mmol), DL-dithiothreitol (377 mg, 2.45 mmol, 1.2 eq.), 3,3'-dithiobis(propionitrile) **II-108** (421 mg, 2.45 mmol, 1.2 eq.) and K_2CO_3 (676 mg, 4.90 mmol, 2.4 eq) were dissolved in dry DMF (15 mL) and the mixture was stirred at r.t. After 67 h, DL-dithiothreitol (63 mg, 0.41 mmol, 0.2 eq.) and 3,3'-dithiobis(propionitrile) **II-108** (70 mg, 0.41 mmol, 0.2 eq.) were added and the mixture was stirred for an additional 48 h. CH_2Cl_2 (200 mL) was added and the organic layer was washed with water (3×200 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel chromatography (CH_2Cl_2 to $CH_2Cl_2/EtOAc$ 98:2) affording tetraethyl di[(2-cyanoethyl)thio] **II-109** (905 mg, 75%) as a yellow amorphous solid.

R_f = 0.40 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 7.93 (s, 2H, H_{Ar}), 4.39 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CO_2CH_2), 4.37 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CO_2CH_2), 3.28 (t, J = 7.3 Hz, 4H, SCH_2), 2.68 (t, J = 7.3 Hz, 4H, CH_2CN) 1.42 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH_2CH_3), 1.41 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 167.1; 166.6 (2s, 4C, $\underline{CO_2CH_2}$), 134.9 (s, 2C), 134.3 ($C_{Ar}S$), 132.8 (s, 2C), 130.8 (CH_{Ar}), 127.9 (s, 2C), 117.5 (s, 2C, CN), 62.44; 62.41 (2s, 4C, $CO_2\underline{CH_2}$), 30.4 (s, 2C, SCH_2), 18.3 (s, 2C, $\underline{CH_2}CN$), 14.2; 14.1 (2s, 4C, $CH_2\underline{CH_3}$).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $C_{28}H_{30}N_2NaO_8S_2$: $[M+Na]^+ = 609.1336$, found 609.1348.

Tetraethyl 2,3,6,7-tetra[(2-cyanoethyl)thio]naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester II-115

Tetrabromo **II-114** (64 mg, 0.087 mmol), 3,3'-dithiobis(propionitrile) **II-108** (375 mg, 2.18 mmol, 25 eq.) and sodium borohydride (41 mg, 1.09 mmol, 12.5 eq.) were dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry $CHCl_3$ (2.5 mL) and dry DMF (2.5 mL). The resulting reddish solution was stirred at r.t. during 19 h. CH_2Cl_2 (40 mL) was added and washed with 2M HCl (50 mL) and water (2×50 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. The crude

residue was purified by flash silica gel chromatography (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/EtOAc 90:10) affording tetra(2-cyanoethyl)thio **II-115** as a slightly yellow amorphous solid (40 mg, 61%).

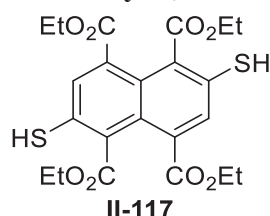
$R_f = 0.20$ (CH₂Cl₂/MeOH 99:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 4.42 (q, $J = 7.2$ Hz, 8H, CO₂CH₂), 3.27 (d, $J = 7.2$ Hz, 8H, SCH₂), 2.62 (d, $J = 7.2$ Hz, 8H, CH₂CN), 1.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 12H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 165.9 (s, 4C, C=O₂CH₂), 141.7 (s, 4C, C_{Ar}CO₂), 137.1 (s, 4C, C_{Ar}S), 126.6 (s, 2C, C_{Ar4a} + C_{Ar8a}), 117.8 (s, 4C, CN), 63.3 (s, 4C, CO₂CH₂), 33.6 (s, 4C, SCH₂), 18.3 (s, 4C, CH₂CN), 13.9 (s, 4C, CH₂CH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₃₄H₃₆N₄NaO₈S₄ : [M+Na]⁺ = 779.1308, found 779.1313.

Tetraethyl 2,6-dimercaptanaphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic tetraester **II-117**

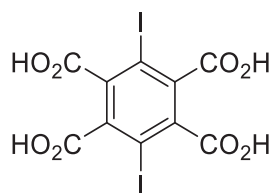


Di(2-cyanoethyl)thio **II-109** (50 mg, 0.085 mmol) was dissolved under inert atmosphere in degassed 1M KOH in *i*PrOH (5 mL). The yellow solution was stirred at r.t. during 3 h and turned red. Conc. HCl was added to reach pH 1. The solvent was dried and the resulting crude product was suspended in water and filtered to afford dimercapto **II-117** (35 mg, 85%) as a beige amorphous solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.02 (s, 2H, H_{Ar}), 4.35 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH₂), 4.33 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH₂), 1.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 168.7; 168.3 (2s, 4C, CO₂CH₂), 136.3 (s, 2C), 133.9 (CH_{Ar}), 133.1 (s, 2C), 129.7 (s, 2C), 129.0 (s, 2C), 63.2; 63.1 (2s, 4C, CO₂CH₂), 14.3; 14.2 (2s, 4C, CH₂CH₃).

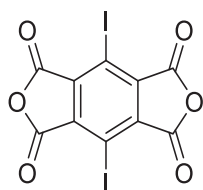
HR-ESI-MS (negative mode) m/z : calcd. for C₂₂H₂₃O₈S₂ : [M-H]⁻ = 479.0840, found 479.0817.

1,4-Diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid II-119**II-119**

1,4-Diiodo-2,3,5,6-tetramethylbenzene **II-118** (10 g, 25.9 mmol) was dissolved in *t*-BuOH (50 ml). A solution of potassium permanganate (21 g, 133 mmol, 5.1 eq. in water (50 mL) was added dropwise over 45 min. The resulting purple solution was heated to reflux during 4 h before potassium permanagate (10.5 g, 66.5 mmol, 2.5 eq.) in water (50 mL) was added. The mixture was heated to reflux during an additional 4 h before being cooled down at r.t. and stirred during 14 h. Again, potassium permanagate (10.5 g, 66.5 mmol, 2.5 eq.) in water (50 mL) was added and heated to heated to reflux during 5 h. Reaction was cooled to 70°C, EtOH (20 mL) was added and the brownish solution was stirred during 2 h. 1M KOH (200 mL) was prepared and the reaction mixture was added to this solution affording a suspension which was stirred at r.t. during 1 h. The suspension was heated to reflux, hot-filtered and washed with water (200 mL). Filtrate was cooled to 0°C and conc. HCl was added to reach pH 1. The solution was evaporated before the resulting crude residue being suspended in acetone (300 mL). The mixture was filtered, washed with acetone (100 mL). The filtrate was evaporated to afford 1,4-diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid **II-119** (25.6 mmol, >95%) as an off-white amorphous solid.

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6): 167.4 (s, 4C, CO₂H), 140.6 (s, 4C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{CO}_2\text{H}$), 91.2 (s, 2C, C_{Ar}I).

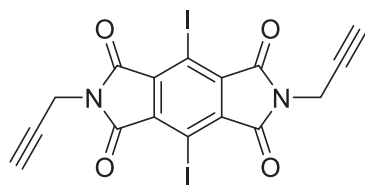
^{13}C NMR data was in agreement with the literature.¹⁶²

1,4-Diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid dianhydride II-120**II-120**

1,4-Diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid **II-119** (2.56 g, 5.06 mmol) was suspended under inert atmosphere (Ar) in acetic acid (12.5 mL) and acetic anhydride (12.5 mL). The mixture was heated to reflux during 14 h. After cooling, the reaction mixture was filtered and washed with acetic acid (5 mL). The precipitate was dried under vacuum to afford 1,4-diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid dianhydride **II-120** (2.50 mmol, 49%) as a bright yellow solid.

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6): 159.7 (s, 4C, CO₂), 141.0 (s, 4C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{CO}_2$), 89.0 (s, 2C, C_{Ar}I).

^{13}C NMR data was in agreement with the literature.¹⁶²

N,N'*-Di(propyn-2-yl)-3,6-diiodopyromellitic diimide **II-121***II-121**

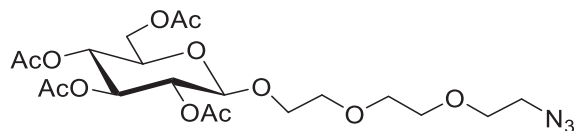
1,4-Diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid dianhydride **II-120** (870 mg, 1.85 mmol) was suspended under inert atmosphere (Ar) in acetic acid (50 mL). Propargyl amine (950 μ L, 14.8 mmol, 8 eq.) was added and the mixture was heated to reflux during 14 h. After cooling to r.t., water (40 mL) was added and the formation of a brownish precipitate was observed. The solid was filtered and washed with water (100 mL) affording *N,N'*-di(propyn-2-yl)-3,6-diiodopyromellitic diimide **II-121** (920 mg, 91%) as a brown solid.

R_f = 0.9 (EtOAc/MeOH/TFA 90:10:1)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 4.34 (s, 4H, NCH₂), CH under DMSO peak, around 2.50 ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): 163.2 (s, 4C, C=O), 138.0 (s, 4C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}=\text{O}$), 85.9 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{I}$), 77.6 (s, 2C, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 74.3 (s, 2C, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 27.5 (s, 2C, NCH₂).

HR-ESI-MS (negative mode) m/z : calcd. for C₁₆H₅I₂N₂O₄ : [M-H]⁻ = 543.8423, found 543.8430.

1-Azido-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **II-122-Glc****II-122-Glc**

1-Chloro-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **II-137-Glc** (32.4 g, 64.8 mmol) was dissolved in dry DMF (400 mL). Tetrabutylammonium iodide (12 g, 32.4 mmol, 0.5 eq.) then sodium azide (8.4 g, 129.6 mmol, 2 eq.) were added under inert atmosphere (Ar) with plastic spatula. The suspension was stirred at 50°C during 72 h. The reaction was cooled to r.t. and EtOAc (200 mL) was added and the suspension was filtered and washed with EtOAc (300 mL). Filtrate was evaporated and co-evaporated with toluene (3 $\times$ 100 mL). The crude residue was suspended in EtOAc (400 mL) and filtered. Filtrate was again evaporated and co-evaporated with toluene (3 $\times$ 100 mL). The oily residue was purified by two successive flash silica gel column chromatographies (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford 1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **II-122-Glc** (15.5 g, 46% over two steps) as a slightly brown oil.

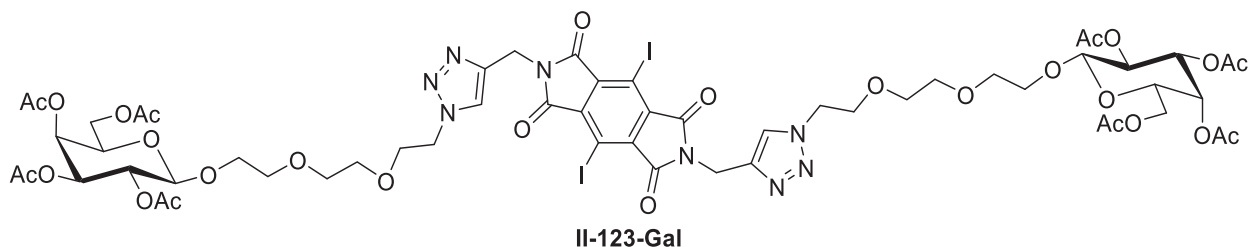
R_f = 0.30 (Cyclohexane/EtOAc 50:50)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 5.20 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, H_3), 5.07 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, H_4), 4.99 (dd, $J = 8.0$; 9.5 Hz, 1H, H_2), 4.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1), 4.25 (dd, $J = 4.7$; 12.3 Hz, 1H, H_6), 4.13 (dd, $J = 2.4$; 12.3 Hz, 1H, H_6), 3.98-3.90 (m, 1H, CH_2OGlc), 3.76-3.60 (m, 10H, $\text{H}_5 + \text{CH}_2\text{OGlc} + 4 \times \text{CH}_2\text{O}$), 3.39 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.08; 2.04; 2.01; 1.99 ($4 \times 3\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.7; 170.3; 169.49; 169.43 (4C, COCH_3), 100.9, (C_1), 72.9 (C_3), 71.8 (C_5), 71.3 (C_2), 70.76; 70.73; 70.5; 70.1 (4C, CH_2O), 69.1 (CH_2OGlc), 68.5 (C_4), 50.7 (NCH_2), 20.79; 20.71; 20.66; 20.65 (4C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{NaO}_{12}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 528.1800$, found 528.1802.

N,N'*-Di({1-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl]-1,2,3-triazol-4-yl}methyl)-3,6-diiodopyromellitic diimide **II-123-Gal*



Prepared according to the general procedure **C** from pyromellitic diimide **II-121** (200 mg, 0.367 mmol), azide **II-122-Gal** (464 mg), copper iodide (18 mg) and $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (160 μL) affording the desired digalactoside **II-123-Gal** (470 mg, 82%) as a bright yellow amorphous solid.

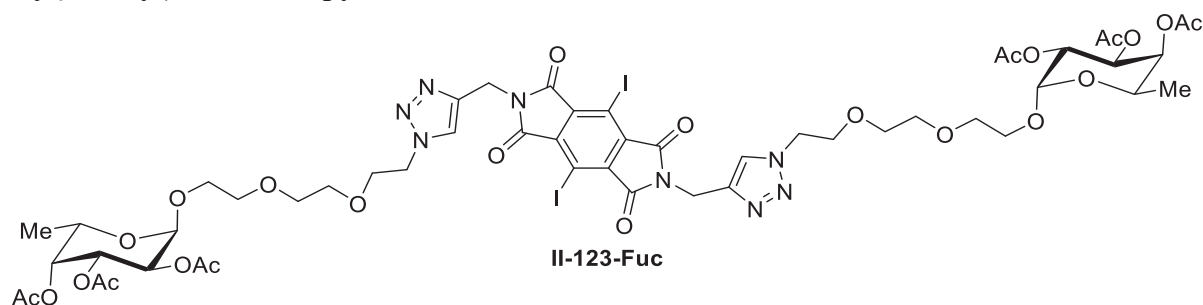
$R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8.02 (s, 2H, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 5.37 (bs, 2H, H_3 or H_4), 5.14 (m, 4H, $\text{H}_2 + \text{H}_3$ or H_4), 5.00 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 4.79 (m, 2H, H_1), 4.56 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2$), 4.24-4.17 (m, 2H, H_5), 4.15-4.10 (m, 4H, H_6), 3.95-3.86 (m, 4H, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.78-3.70 (m, 2H, CH_2OGal), 3.62-3.52 (m, 14H, $3 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 2.13; 2.00; 1.98; 1.91 ($4 \times 6\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.6; 170.3; 169.8 (4s, 8C, COCH_3), 164.5 (s, 4C, $\text{C}=\text{O}$), 142.5 (s, 2C, $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 139.4 (s, 4C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}=\text{O}$), 124.8 (s, 2C, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 101.9 (s, 2C, C_1), 84.3 (s, 2C, C_{ArI}), 71.7; 69.8; 68.3 (3s, 6C, $\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4$), 71.4 (s, 2C, C_5), 71.2; 71.1; 70.9 (3s, 6C, CH_2O), 70.0; 69.9 (2s, 4C, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2\text{CH}_2 + \text{CH}_2\text{OGal}$), 62.2 (s, 2C, C_6), 50.8 (s, 2C, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2$), 34.7 (s, 2C, $\text{NCH}_2\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 20.8; 20.66; 20.61; 20.5 ($4 \times \text{C}$, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{56}\text{H}_{70}\text{I}_2\text{N}_8\text{O}_{28}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 778.1189$, found 778.1205.

N,N'*-Di({1-[3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]-1,2,3-triazol-4-yl}methyl)-3,6-diiodopyromellitic diimide **II-123-Fuc*



Prepared according to the general procedure **C** from pyromellitic diimide **II-121** (50 mg, 0.092 mmol), azide **II-122-Fuc** (102 mg), copper iodide (4.4 mg), *i*Pr₂NEt (40 μ L) and dry DMF (2 mL) affording the desired difucoside **II-123-Fuc** (99 mg, 74%) as a yellow oil.

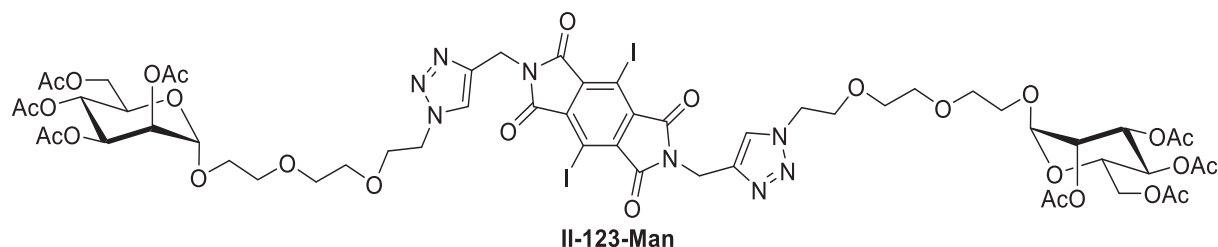
R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.78 (s, 2H, CH_{triazole}), 5.31 (d, J = 10.5 Hz, 2H, H₂), 5.22 (s, 2H, H₃), 5.07-5.00 (m, 4H, H₁ + H₄), 4.97 (s, 4H, NCH₂C^{IV}_{triazole}), 4.47 (bs, 4H, N_{triazole}CH₂), 4.17 (q, J = 6.5 Hz, 2H, H₅), 3.80 (bs, 4H, N_{triazole}CH₂CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂OFuc), 3.64-3.50 (m, 14H, 3 $\times$ CH₂O + CH₂OFuc), 2.10; 1.99; 1.91 (3 $\times$ 6H, COCH₃), 1.06 (d, J = 6.5 Hz, 6H, H₆).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.9; 170.6; 170.3 (3s, 6C, COCH₃), 163.4 (s, 4C, C=O), 141.4 (s, 2C, C^{IV}_{triazole}), 138.5 (s, 4C, C_{Ar}C=O), 124.5 (s, 2C, CH_{triazole}), 96.4 (s, 2C, C₁), 83.9 (s, 2C, C_{Ar}I), 71.3 (s, 2C, C₃), 70.78; 70.75; 70.4 (3s, 6C, CH₂O), 69.6 (N_{triazole}CH₂CH₂), 68.4 (s, 2C, C₄), 68.1 (s, 2C, C₂), 67.5 (s, 2C, CH₂OFuc), 64.5 (s, 2C, C₅), 50.5 (s, 2C, N_{triazole}CH₂), 34.1 (s, 2C, NCH₂C^{IV}_{triazole}), 21.0; 20.88; 20.83 (3s, 6C, COCH₃), 16.1 (s, 2C, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₅₂H₆₆I₂N₈O₂₄ : [M+2H]²⁺ = 720.1134, found 720.1150.

N,N'*-Di({1-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl]-1,2,3-triazol-4-yl}methyl)-3,6-diiodopyromellitic diimide **II-123-Man*



Prepared according to the general procedure **C** from pyromellitic diimide **II-121** (200 mg, 0.367 mmol), azide **II-122-Man** (464 mg), copper iodide (18 mg), *i*Pr₂NEt (160 μ L) and dry DMF (10 mL) affording the desired dimannoside **II-123-Man** (382 mg, 67%) as a bright yellow amorphous solid.

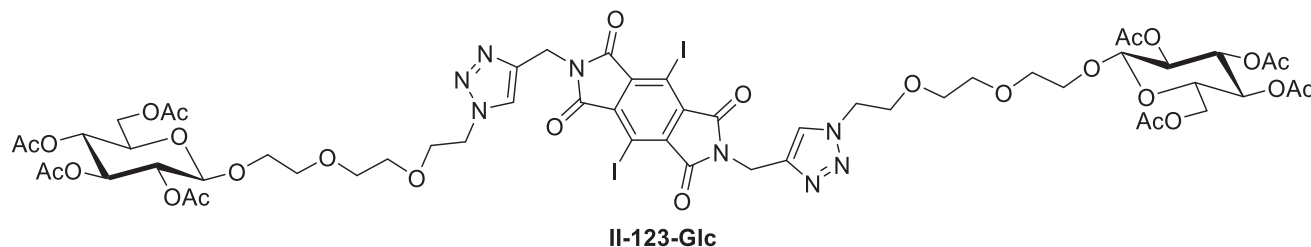
R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.85 (s, 2H, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 5.36-5.24 (m, 6H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4$), 5.03 (s, 4H, $\text{NCH}_2\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 4.89 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H_1), 4.54 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2$), 4.22-4.10 (m, 6H, $\text{H}_5 + \text{H}_6$), 3.90-3.85 (m, 4H, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.84-3.80 (m, 2H, CH_2OMan) 3.74-3.57 (m, 14H, $\text{CH}_2\text{OMan} + 3 \times \text{CH}_2\text{O}$), 2.14; 2.09; 2.03; 1.98 ($4 \times 6\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.2; 170.1, 169.8 (4s, 8C, COCH_3), 163.4 (s, 4C, $\text{C}=\text{O}$), 141.4 (s, 2C, $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 138.5 (s, 4C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}=\text{O}$), 124.4 (s, 2C, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 97.8 (s, 2C, C_1), 83.9 (s, 2C, C_{ArI}), 70.8; 70.7; 70.2, (3s, 6C, CH_2O) 69.7 (s, 2C, C_2), 69.6 (s, 2C, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 69.2 (s, 2C, C_3), 68.6 (s, 2C, C_5), 67.5 (s, 2C, CH_2OMan), 66.3 (s, 2C, C_4), 62.6 (s, 2C, C_6), 50.5 (s, 2C, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2$), 34.1 (s, 2C, $\text{NCH}_2\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 21.1, 20.9, 20.88; 20.86 (4s, 8C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{56}\text{H}_{70}\text{I}_2\text{N}_8\text{O}_{28}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 778.1189$, found 778.1210.

N,N'*-Di({1-[3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-oct-1-yl]-1,2,3-triazol-4-yl}methyl)-3,6-diiodopyromellitic diimide **II-123-Glc*



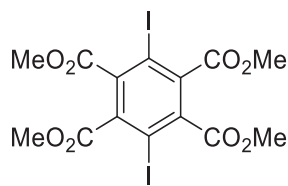
Prepared according to the general procedure **C** from pyromellitic diimide **II-121** (200 mg, 0.367 mmol), azido **II-122-Glc** (464 mg), copper iodide (18 mg), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (160 μL) and dry DMF (10 mL) affording the diglucoside **II-123-Glc** (380 mg, 67%) as a bright yellow amorphous solid.

$R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.83 (s, 2H, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 5.21 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 2H, H_3), 5.09 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 2H, H_4), 5.03 (m, 6H, $\text{NCH}_2\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}} + \text{H}_2$), 4.61 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_1), 4.52 (bs, 4H, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2$), 4.25 (dd, $J = 3.1$; 12.3 Hz, 2H, H_6), 4.14 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H, H_6'), 4.00-3.93 (m, 2H, CH_2OGlc), 3.85 (bs, 4H, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.76-3.70 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{OGlc} + \text{H}_5$), 3.64-3.54 (m, $3 \times 4\text{H}$, CH_2O), 2.07; 2.02; 2.00 ($4 \times 6\text{H}$, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 170.8; 170.4; 169.6; 169.5 (4s, 8C, COCH_3), 163.4 (s, 4C, $\text{C}=\text{O}$), 141.4 (s, 2C, $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 138.5 (s, 4C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}=\text{O}$), 124.4 (s, 2C, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 101.0 (s, 2C, C_1), 84.0 (s, 2C, C_{ArI}), 72.9 (s, 2C, C_3), 72.0 (s, 2C, C_5), 71.4 (s, 2C, C_2), 70.76; 70.75; 70.4 (3s, 6C, CH_2O), 69.5 (s, 2C, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 69.4 (s, 2C, CH_2OGlc), 68.6 (s, 2C, C_4), 62.1 (s, 2C, C_6), 50.5 (s, 2C, $\text{N}_{\text{triazole}}\text{CH}_2$), 34.1 (s, 2C, $\text{NCH}_2\text{C}^{\text{IV}}_{\text{triazole}}$), 20.9; 20.8; 20.77; 20.76 (4s, 8C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{56}\text{H}_{70}\text{I}_2\text{N}_8\text{O}_{28}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 778.1189$, found 778.1194.

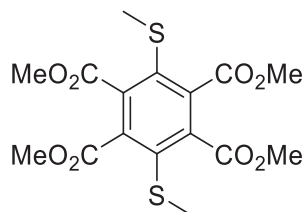
Tetramethyl 3,6-diiodobenzene-1,2,4,5-tetracarboxylate tetraester II-131**II-131**

Powdered KOH (92 mg, 1.64 mmol, 1.64 eq.) was dissolved in dry DMSO (5 mL) and stirred during 30 min before a solution of 1,4-diiodobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid **II-119** (506 mg, 1 mmol) in dry DMSO (5 mL) was added. The mixture was further stirred during 15 min before being cooled at 0°C via an ice bath. Iodomethane (373 μ L, 6 mmol, 6 eq.) was added dropwise and the reddish solution was allowed to warm to r.t. and stirred during 14 h. Iodomethane (6 eq.) was added and stirring was continued for an additional 7 h before iodomethane (1.5 eq) and KOH (0.7 eq) were added. The solution was stirred during 18 h then more iodomethane (1.5 eq) and KOH (0.7 eq) were added. After 7 h, KOH (0.7 eq.) was added and the mixture was stirred during 4 h before more KOH (1.4 eq.) was added. After 14 h, a final batch of KOH (1.4 eq) was added and the solution was stirred for a further 6 h. Ice (20 g) then water (25 mL) was added to the solution. Extraction was performed with EtOAc (3 $\times$ 30 mL). The organic layers were combined, washed with brine (5 $\times$ 30 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford tetramethyl 3,6-diiodobenzene-1,2,4,5-tetracarboxylate tetraester **II-131** (511 mg, 91%) as a red solid.

R_f = 0.9 (EtOAc)

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆): 166.4 (s, 4C, $\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$), 141.7 (s, 4C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{CO}_2\text{CH}_3$), 91.8 (s, 2C, C_{ArI}), 53.5 (s, 4C, CH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{I}_2\text{NaO}_8$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 584.8514$, found 584.8510.

Tetramethyl 3,6-di(methylthio)benzene-1,2,4,5-tetracarboxylic tetraester II-132**II-132**

Tetramethyl 3,6-dibromobenzene-1,2,4,5-tetracarboxylic tetraester **II-135** (50 mg, 0.107 mmol), sodium thiomethoxide (150 mg, 2.14 mmol, 20 eq.) and 18-crown-6 (3 mg, 0.011 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in dry CHCl_3 (2.5 mL) and dry DMF (2.5 mL). The mixture was heated at 85°C during 72 h. Cyclohexane (40 mL) was added and washed with water (5 $\times$ 40 mL). Organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated. The crude residue was purified by flash silica gel column chromatography (CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) affording tetramethyl

3,6-di(methylthio)benzene-1,2,4,5-tetracarboxylic tetraester **II-132** (29 mg, 67%) as a green amorphous solid.

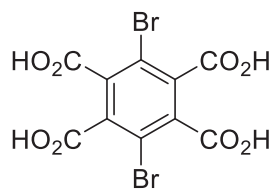
$R_f = 0.30$ (CH_2Cl_2)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 3.92 (s, 12H, CO_2CH_3), 2.44 (s, 6H, SCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 166.3 (s, 4C, $\underline{\text{CO}_2\text{CH}_3}$), 140.6 (s, 4C, $\underline{\text{C}_{\text{Ar}}\text{CO}_2\text{CH}_3}$), 133.4 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$), 53.2 (s, 4C, $\text{CO}_2\underline{\text{CH}_3}$), 21.6 (s, 2C, SCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 425.0335$, found 425.0315

1,4-Dibromobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid **II-134**

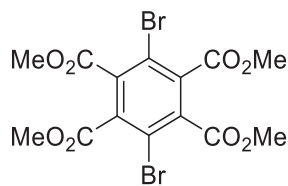


II-134

1,4-Dibromo-2,3,5,6-tetramethylbenzene **II-133** (5 g, 17.1 mmol) was dissolved under inert atmosphere (Ar) in *t*-BuOH (30 mL). A solution of potassium permanganate (13.8 g, 87.3 mmol, 5.1 eq.) in water (30 mL) was added dropwise. The resulting purple solution was heated to reflux during 4 h then potassium permanganate (5 eq.) in water (30 mL) was added and the mixture was heated at reflux during an additional 5 h. The reaction was cooled to 70°C, EtOH (20 mL) was added and the brownish solution was stirred during 30 min at 70°C before being cooled to r.t.. 1M KOH (200 mL) was prepared and the reaction mixture was added to this solution affording a suspension which was heated to reflux, hot-filtered and washed with water (2×100 mL). The filtrate was cooled to 0°C and conc. HCl was added to reach pH 1. The solution was evaporated and the resulting crude residue was suspended in acetone (300 mL). The mixture was filtered and washed with acetone (50 mL). The filtrate was evaporated to afford 1,4-dibromobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid **II-134** (5.73 g, 81%) as an amorphous white solid.

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6): 165.8 (s, 4C, CO_2H), 138.2, (s, 4C, $\underline{\text{C}_{\text{Ar}}\text{CO}_2}$), 116.3 (s, 2C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{Br}$).

^{13}C NMR data was in agreement with the literature.¹⁶²

Tetramethyl 3,6-dibromobenzene-1,2,4,5-tetracarboxylic tetraester II-135**II-135**

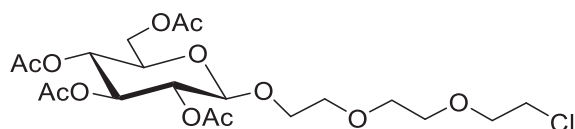
Powdered KOH (1.09 g, 19.4 mmol, 8 eq.) was dissolved in dry DMSO (10 mL) and stirred during 30 min before a solution of 1,4-dibromobenzene-2,3,5,6-tetracarboxylic acid **II-134** (1 g, 2.42 mmol) in dry DMSO (10 mL) was added. The mixture was further stirred during 15 min then iodomethane (3 mL, 48.4 mmol, 20 eq.) was added dropwise and the reddish solution was stirred during 24 h. Ice (50 g) then water (50 mL) was added to the solution and extraction was performed with EtOAc (3×50 mL). The organic layers were combined and washed with brine (4×100 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford tetramethyl 3,6-dibromobenzene-1,2,4,5-tetracarboxylic tetraester **II-135** (715 mg, 63%) as an amorphous red solid.

$R_f = 0.95$ (EtOAc)

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆): 3.94 (s, 12H, CO₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆): 165.2 (s, 4C, CO₂CH₃), 138.3 (s, 4C, C_{Ar}CO₂CH₃), 117.6 (s, 2C, C_{Ar}Br), 54.0 (s, 2C, CO₂CH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for C₁₄H₁₂Br₂NaO₈ : [M+Na]⁺ = 488.8791, found 488.8787.

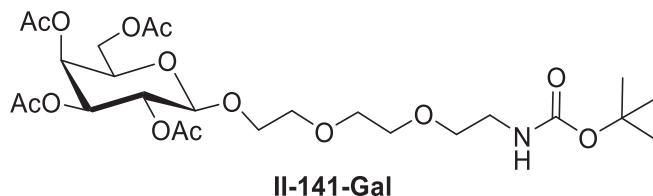
1-Chloro-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside II-137-Glc**II-137-Glc**

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside **II-136-Glc** (26 g, 66.7 mmol) and silver trifluoroacetate (22 g, 100 mmol, 1.5 eq.) were dissolved under inert atmosphere (Ar) in dry CH₂Cl₂ (500 mL) before addition of 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (9.7 mL, 66.7 mmol, 1 eq.). Tin (IV) chloride (1M in CH₂Cl₂, 200 mL, 200 mmol, 3 eq.) was slowly added dropwise over 1 h and the white suspension was stirred at r.t. during 3.5 h. The reaction was stirred vigorously and satd. NaHCO₃ (800 mL) then solid NaHCO₃ (~20g) was added by portion to reach pH 8. The resulting white suspension was stirred at r.t. during 16 h before being filtered. Tin salts were suspended in CH₂Cl₂ (400 mL) and filtered again. Both filtrates were combined and the two layers were separated. The aqueous layer was washed with CH₂Cl₂ (4×400 mL) and all organic layers were combined. This new organic layer was splitted in two and both were washed with satd. NaHCO₃ (250 mL), water (2×200 mL) and brine (2×200 mL). Organic layers were combined, dried (MgSO₄), filtered and evaporated affording a mix of 1-chloro-3,6-

dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **II-137-Glc** and some impurities (32.4 g). The product was used in the next step without further purification

$R_f = 0.30$ (Cyclohexane/EtOAc 50:50)

Tert*-butyl [3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyloxy)-oct-1-yl] carbamate **II-141-Gal*



Prepared according to the general procedure **D** from azide **II-122-Gal** (505 mg), Boc_2O (436 mg) and Pd/C 10% (100 mg) affording the desired Boc-amine **II-141-Gal** (580 mg, 99%) as a colorless oil.

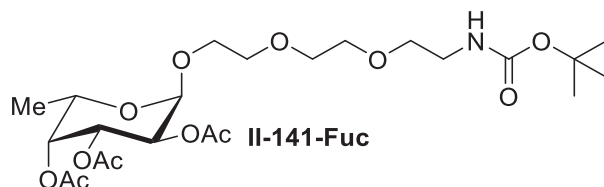
$R_f = 0.90$ (EtOAc)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.33 (dd, $J = 0.9$; 3.4 Hz, 1H, H_4), 5.15 (dd, $J = 7.9$; 10.5 Hz, 1H, H_2), 4.97 (dd, $J = 3.4$; 10.5 Hz, 1H, H_3), 4.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_1), 4.16-4.05 (m, 2H, H_6), 3.96-3.84 (m, 2H, $\text{H}_5 + \text{CH}_2\text{OGal}$), 3.75-3.67 (m, 1H, CH_2OGal), 3.66-3.53 (m, $3 \times 2\text{H}$, CH_2O), 3.48 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.40 (td, $J = J' = 5.3$ Hz, 2H, NCH_2), 2.10; 2.01; 1.99; 1.93 ($4 \times 3\text{H}$, COCH_3), 1.39 (s, 9H, CMe_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.4; 170.3; 170.1; 169.5 (4C, COCH_3), 156.0 (CO_2tBu), 101.4 (C_1), 79.2 (CMe_3), 70.9 (C_3), 70.71 (C_5), 70.69; 70.3; 69.1 (3s, 5C, $4 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OGal}$), 68.9 (C_2), 67.1 (C_4), 61.3 (C_6), 40.4 (NCH_2), 28.5 (CMe_3), 20.8; 20.69; 20.68; 20.6 (4C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NNaO}_{14}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 602.2419$, found 602.2429.

Tert*-butyl [3,6-dioxa-8-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyloxy)-oct-1-yl]carbamate **II-141-Fuc*



Prepared according to the general procedure **D** from azide **II-122-Fuc** (480 mg), Boc_2O (468 mg) and Pd/C 10% (100 mg) affording the desired Boc-amine **II-141-Fuc** (350 mg, 67%) as a colorless oil.

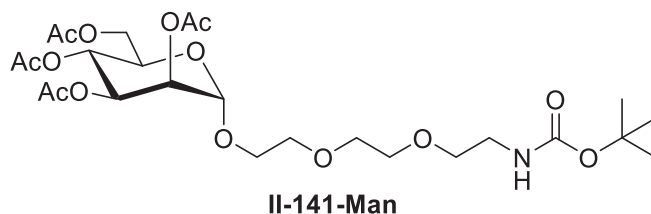
$R_f = 0.90$ (100% EtOAc)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.30-5.23 (m, 1H, H_2), 5.19-5.15 (m, 1H, H_4), 5.05-4.97 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_3$), 4.11 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H_5), 3.75-3.65 (m, 1H, CH_2OFuc), 3.62-3.47 (m, 7H, $3 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OFuc}$), 3.44 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.20 (td, $J = J' = 5.2$ Hz, 2H, NCH_2), 2.06; 1.98; 1.88 (3s, $3 \times 3\text{H}$, COCH_3), 1.33 (s, 9H, CMe_3), 1.03 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H_6).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.5; 170.3; 169.9 (3C, COCH_3), 155.9 (CO_2tBu), 96.1 (C_1), 79.0 (CMe_3), 71.1 (C_4), 70.6; 70.2; 70.1; (3s, $4 \times \text{C}$, CH_2O), 68.1; 67.9 (2C, $\text{C}_2 + \text{C}_3$), 67.3 (CH_2OFuc), 64.2 (C_5), 40.2 (NCH_2), 28.3 (CMe_3), 20.7; 20.6; 20.5 ($3 \times \text{C}$, COCH_3), 15.8 (C_6).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NNaO}_{12}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 544.2364$, found 544.2360.

Tert*-butyl [3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-oct-1-yl] carbamate **II-141-Man*



Prepared according to the general procedure **D** from azide **II-122-Man** (560 mg), Boc_2O (483 mg) and Pd/C 10% (100 mg) affording the desired Boc-amine **II-141-Man** (522 mg, 81%) as a colorless oil.

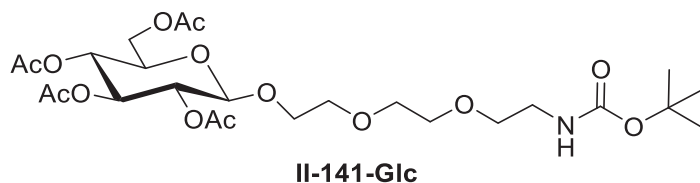
$R_f = 0.90$ (100% EtOAc)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.33-5.17 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_3 + \text{H}_4$), 5.02 (bs, 1H, NH), 4.81 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H_1), 4.22 (dd, $J = 5.1$; 12.4 Hz, 1H, H_6), 4.08-3.96 (m, 2H, $\text{H}_5 + \text{H}_6$), 3.80-3.70 (m, 1H, CH_2OMan), 3.67-3.53 (m, 7H, $3 \times \text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OMan}$), 3.48 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.25 (td, $J = J' = 5.2$ Hz, 2H, NCH_2), 2.09; 2.04; 1.98; 1.93 ($4 \times 3\text{H}$, COCH_3), 1.37 (s, 9H, CMe_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.6; 170.0; 169.9; 169.7 ($4 \times \text{C}$, COCH_3), 156.0 (CO_2tBu), 97.8 (C_1), 79.1 (CMe_3), 70.7; 70.3; 70.0 (3s, $4 \times \text{C}$, CH_2O), 69.6; 69.1; 66.1 ($3 \times \text{C}$, $\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4$), 68.4 (C_5), 67.4 (CH_2OMan), 62.4 (C_6), 40.3 (NCH_2), 28.4 (CMe_3), 20.9; 20.7; 20.69; 20.68 ($4 \times \text{C}$, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NNaO}_{14}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 602.2419$, found 602.2406.

Tert*-butyl [3,6-dioxa-8-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-oct-1-yl] carbamate **II-141-Glc*



Prepared according to the general procedure **D** from azide **II-122-Glc** (200 mg), Boc_2O (173 mg) and Pd/C 10% (100 mg) affording the desired Boc-amine **II-141-Glc** (152 mg, 66%) as a colorless oil.

$R_f = 0.90$ (EtOAc)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.16 (dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 1H, H_3), 5.04 (bs + dd, $J = J' = 9.5$ Hz, 2H, $\text{NH} + \text{H}_4$), 4.95 (dd, $J = 8.0$; 9.5 Hz, 1H, H_2), 4.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1), 4.22 (dd, $J = 4.7$; 12.3 Hz, 1H, H_6), 4.09 (dd, $J = 2.3$; 12.3 Hz, 1H, H_6'), 3.96-3.88 (m, 1H, CH_2OGlc), 3.76-3.64 (m, 2H, $\text{H}_5 + \text{CH}_2\text{OGlc}$), 3.63-3.54 (m, 3 $\times$ 2H, CH_2O), 3.49 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.27 (q, $J = 5.2$ Hz, 2H, NCH_2), 2.04; 2.00; 1.98; 1.96 (4 $\times$ 3H, COCH_3), 1.40 (s, 9H, CMe_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.7; 170.3; 169.47; 169.41 (4C, COCH_3), 156.0 (CO_2tBu), 100.9 (C_1), 79.2 (CMe_3), 72.8 (C_3), 71.8 (C_5), 71.3 (C_2), 70.7; 70.3 (2s, 4 $\times$ C, CH_2O), 69.2 (CH_2OGlc), 68.4 (C_4), 62.0 (C_6), 40.4 (NCH_2), 28.5 (CMe_3), 20.8; 20.7; 20.67; 20.65 (4C, COCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NNaO}_{14}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 602.2419$, found 602.2423.

IV.3. Dynamic combinatorial libraries

IV.3.1. General procedures

General procedure H without lectin :

In a typical experiment, the thiophenols (mM overall) were dissolved in buffer (Tampon-A-E). The mixtures was allowed to oxidize and equilibrate by stirring (400 rpm) in an open vial at r.t. The reaction was monitored by HPLC (LC-A-C) on column (Col-A-B) with gradient (A-B) by injection of the solution (4 μL for 4 mM solution). UV absorbance was recorded at 210 and 254 nm.

General procedure I with lectin (See Chapter 3, Figure 15):

In a typical experiment, the thiophenols (4 mM overall) were suspended in Tampon-A. The mixture was allowed to oxidize and equilibrate by stirring in an open vial at r.t. (library 1). After 3.5 h, two dynamic libraries were prepared in open vials. In the first one (library 2), library 1 was diluted ten times with tampon-A affording a library composed of thiophenols (0.4 mM overall). The second one (library 3) was diluted ten times with tampon-A and lectin was added

resulting in a DLC composed of thiophenols (0.4 mM overall) and lectin. After 2.25 h, the reference library was diluted twice with 1M HCl and analysed by HPLC (Echantillon 1, LC-A, Col-A, Grad-B) by injection of 40 µL of the solution. At the same time, the library analysis was centrifugated (2 min, 10 000 rpm). The supernatant was collected and diluted twice with 1M HCl and analysed by HPLC (Echantillon 2, LC-A, Col-A, Grad-B) by injection of 40 µL of the solution. The precipitate was diluted in tampon-A and 1M HCl (1:1 v/v) to afford the same volume as the reference library and analysed by HPLC (Echantillon 3, LC-A, Col-A, Grad-B) on column Col-A with gradient Grad-B by injection of 40 µL of the solution.

IV.3.2. Protocols

II-76-X (X = G, F, M, Glc)

Prepared according general procedure **H** with **II-76-X (X = G, F, M, Glc)** (4 mM) dissolved in tampon-A (3 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-A), on column (col-A) with gradient (Grad-A) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) 0.4 mM

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (0.4 mM) dissolved in tampon-A (7 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-A), on column (col-A) with gradient (Grad-A) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) Buffer phosphate

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-B (3 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-A), on column (col-A) with gradient (Grad-A) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) 4°C

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-A (3 mL). The sample was placed in the fridge without stirring. The reaction was monitored by HPLC (LC-A), on column (col-A) with gradient (Grad-A) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) without stirring

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-A (3 mL). The sample was oxidized and equilibrated without stirring. The reaction was monitored by HPLC (LC-A), on column (col-A) with gradient (Grad-A) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Man 0.4 mM + ConA 0.4 mM

Prepared according general procedure **I** with **M** (0.4 mM) dissolved in tampon-A (500 µL) and ConA (0.4 mM). The reaction was monitored by HPLC (LC-A), on column (col-A) with gradient (Grad-B) by injections of the solution (4 µL).

II-86 (P)

Prepared according general procedure **H** with **II-86 (P)** (4 mM) dissolved in tampon-**B** (3 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**A**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL). Precipitation of species was observed during equilibration.

II-76-Gal + II-72 (G:A, 4 mM 1:1)

Prepared according general procedure **H** with **G:A** (4 mM, 1:1) dissolved in tampon-**A** (3 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**A**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL). Total absorbance decreased over time revealing heterogeneous aggregation process.

II-76-Man + II-76-Fuc (M:F, 4 mM 1:1)

Prepared according general procedure **H** with **M:F** (4 mM, 1:1) dissolved in tampon-**A** (510 µL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**A**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**B**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Man + II-76-Fuc (M:F, 0.4 mM 1:1) + ConA 0.4 mM

Prepared according general procedure **I** with **M:F** (0.4 mM, 1:1) dissolved in tampon-**A** (510 µL) and ConA (0.4 mM). The reaction was monitored by HPLC (LC-**A**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**B**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Man + II-76-Fuc (M:F, 0.4 mM 1:3) + ConA 0.4 mM

Prepared according general procedure **I** with **M:F** (0.4 mM, 1:3) dissolved in tampon-**A** (510 µL) and ConA (0.4 mM). The reaction was monitored by HPLC (LC-**A**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**B**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Man + II-76-Fuc (M:F, 0.4 mM 1:3) + ConA 0.1 mM

Prepared according general procedure **I** with **M:F** (0.4 mM, 1:3) dissolved in tampon-**A** (3 mL) and ConA (0.1 mM). The reaction was monitored by HPLC (LC-**A**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**B**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) 4 mM

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) 0.4 mM

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (0.4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (40 µL).

II-76-Fuc (F) NaCl 500 mM

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**D** (800 µL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) NaCl 2M

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**D** (800 µL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) without stirring

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). The mixture was allowed to oxidize and equilibrate without stirring. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) without light

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). The vial was enclosed with aluminium foil and placed in a closet. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) 4°C

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). The vial was placed in a fridge at 4°C. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) 37°C

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). The vial was heated at 7°C with an oil bath. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) buffer acetate

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**C** (800 µL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) pH = 1

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 µL). pH was adjusted to 1 by successive addition of 1M HCl. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 µL).

II-76-Fuc (F) pH = 4

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 μ L). pH was adjusted to 4 by successive addition of 1M HCl. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-76-Fuc (F) pH = 6.4

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 μ L). pH was adjusted to 6.4 by successive addition of 1M HCl. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-76-Fuc (F) pH = 8.4

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 μ L). pH was adjusted to 8.4 by successive addition of 1M NaOH. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-76-Fuc (F) pH = 10

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 μ L). pH was adjusted to 10 by successive addition of 1M NaOH. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-76-Fuc (F) pH = 13

Prepared according general procedure **H** with **II-76-Fuc (F)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (800 μ L). pH was adjusted to 13 by successive addition of 1M NaOH. The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**A**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-93-Man (Y_M)

Prepared according general procedure **H** with **II-93-Man (Y_M)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (3 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**B**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-93-Man (Y_M) 0.4 mM

Prepared according general procedure **H** with **II-93-Man (Y_M)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (7 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**B**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-93-Gal (Y_G) 0.4 mM

Prepared according general procedure **H** with **II-93-Gal (Y_G)** (4 mM) dissolved in tampon-**A** (7 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**B**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

II-76-Man + II-93-Man (M:Y_M, 4 mM 1:1)

Prepared according general procedure **H** with **M:Y_M** (4 mM, 1:1) dissolved in tampon-A (3 mL). The reaction was monitored by HPLC (LC-**B**), on column (col-**B**) with gradient (Grad-**A**) by injections of the solution (4 μ L).

IV.4. Semi-preparative high-performance liquid chromatography

General procedure J for purification of glycoldyn[n]arenes by semi-preparative HPLC :

Dithiol (100 mg, 4 mM) was dissolved in Tampon-A and was allowed to oxidize and equilibrate by stirring (400 rpm) in an open vial at r.t. Progress of the reaction was monitored by HPLC (LC-**B**, Col-**A**, Grad-**A**). Glyco-dyn[n]arene were purified by preparative HPLC (2 mL injections). Acetonitrile from fractions collected was removed by evaporation using a rotary evaporator and the remaining water was lyophilized affording a mixture of glycol-dyn[n]arenes.

Purification of G₃:G₄

Prepared according general procedure **J** from **II-76-Gal (G)** (100 mg, 4 mM) purified by preparative HPLC (LC-**C**, Col-**C**, Grad-**C**) affording a mixture of **G₃:G₄** (77 mg, 77%) as a slightly yellow powder.

Purification of F₃:F₄

Prepared according general procedure **J** from **II-76-Fuc (F)** (100 mg, 4 mM) purified by preparative HPLC (LC-**C**, Col-**C**, Grad-**D**) affording a mixture of **F₃:F₄** (38 mg, 38%) as a slightly yellow powder.

Purification of M₃:M₄

Prepared according general procedure **J** from **II-76-Man (M)** (100 mg, 4 mM) purified by preparative HPLC (LC-**C**, Col-**C**, Grad-**C**) affording a mixture of **M₃:M₄** (28 mg, 28%) as a slightly yellow powder.

Purification of Glc₃:Glc₄

Prepared according general procedure **J** from **II-76-Glc (Glc)** (100 mg, 4 mM) purified by preparative HPLC (LC-**C**, Col-**C**, Grad-**C**) affording a mixture of **Glc₃:Glc₄** (21 mg, 21%) as a slightly yellow powder.

IV.5. Isothermal titration calorimetry

General procedure K for ITC measurements :

Lyophilized ConA (From *Canavalia ensiformis* Type VI, Sigma-Aldrich, cat. n° L7647) or LecA (gracious gift from Dr. Anne Imberty, CERMAV, Grenoble) was dissolved in Tampon-A. Carbohydrate compound was dissolved into the same buffer and placed in the injection syringe. ITC was performed using a VP-ITC 200 MicroCalorimeter from MicroCal Incorporated. LecA was placed into the 200- μ L sample cell, at 25°C. Titrations was performed with 2- μ L injections of carbohydrate ligands every 120 s. Data were fitted using the “one-site

model” using MicroCal Origin 7 software according to standard procedures. Fitted data yield the stoichiometry (n), the association constant (K_a) and the enthalpy of binding (ΔH). Other thermodynamics parameters (i.e., changes in free energy ΔG and entropy ΔS) were calculated from the equation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_a$ in which T is the absolute temperature and $R = 8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Two or three independent titrations were performed for each ligand tested.

Methyl α -D-mannopyranoside vs ConA

Prepared according general procedure **K** with methyl α -D-mannopyranoside (1.8 mM) and ConA (0.12 mM) (See Chapter 3, Figure 27).

II-80-Man vs ConA

Prepared according general procedure **K** with **II-80-Man** (1.8 mM) and ConA (0.12 mM) (See Chapter 3, Figure 27).

M₃:M₄ vs ConA

Prepared according general procedure **K** with a mixture of **M₃:M₄** (0.2 mM, 1:1) and ConA (0.12 mM) (See Chapter 3, Figure 27).

G₃:G₄ vs ConA

Prepared according general procedure **K** with a mixture of **G₃:G₄** (0.2 mM, 1:1) and ConA (0.12 mM) (See Chapter 3, Figure 27).

Methyl β -D-galactopyranoside vs LecA

Prepared according general procedure **K** with methyl β -D-galactopyranoside (1.8 mM) and LecA (0.12 mM) (See Chapter 3, Figure 28).

G₃:G₄ vs LecA

Prepared according general procedure **K** with a mixture of **G₃:G₄** (0.2 mM, 1:1) and LecA (0.12 mM) (See Chapter 3, Figure 28).

Références bibliographiques

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Joo, H.-S.; Otto, M. Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (12), 1503-1513.
- (2) Wagner, S.; Sommer, R.; Hinsberger, S.; Lu, C.; Hartmann, R. W.; Empting, M.; Titz, A. Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (13), 5929-5969.
- (3) Donlan, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infect. Dis.* **2002**, *8* (9), 881-890.
- (4) O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *54* (1), 49-79.
- (5) Sharma, G.; Rao, S.; Bansal, A.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, **2014**, *42* (1), 1-7.
- (6) Folkesson, A.; Jelsbak, L.; Yang, L.; Johansen, H. K.; Ciofu, O.; Høiby, N.; Molin, S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 841-851.
- (7) Lister, P. D.; Wolter, D. J.; Hanson, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (4), 582-610.
- (8) Wilson, R.; Dowling, R. B. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, **1998**, *53* (3), 213-219.
- (9) Laughlin, R. S.; Musch, M. W.; Hollbrook, C. J.; Rocha, F. M.; Chang, E. B.; Alverdy, J. C. The Key Role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I Lectin on Experimental Gut-Derived Sepsis. *Ann. Surg.* **2000**, *232* (1), 133-142.
- (10) Sousa, A. M.; Pereira, M. O. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. *Pathogens*, **2014**, *3* (3), 680-703.
- (11) Strateva, T.; Yordanov, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58* (9), 1133-1148.
- (12) Parmar, H.; Dholakia, A.; Vasavada, D.; Singhala, H. The current status of antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical samples. *Int. J. Med. Res.* **2013**, *2*, 1-6.
- (13) Livermore, D. M. Penicillin-Binding Proteins, Porins And outer-Membrane Permeability of Carbenicillin-Resistant and -Susceptible Strains of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **1984**, *18* (2), 261-270.
- (14) Centers for Disease Control and Prevention https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html (accessed Oct 15, **2018**).
- (15) World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (accessed Oct 15, **2018**).
- (16) Allen, R. C.; Popat, R.; Diggle, S. P.; Brown, S. P. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 300-308.
- (17) Gilboa-Garber, N.; Mizrahi, L.; Garber, N. Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Biochem.* **1977**, *55* (9), 975-981.
- (18) Gilboa-Garber, N. Purification and properties of hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, *273* (1), 165-173.
- (19) Sharon, N.; Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004**, *14* (11), 53R-62R.

- (20) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (2), 555-578.
- (21) Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (1), 525-561.
- (22) Cambi, A.; Figdor, C. G. Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins. *Curr. Opin. Immunol.* **2005**, *17* (4), 345-351.
- (23) Imberty, A.; Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **2004**, *6* (2), 221-228.
- (24) Karaveg, K.; Liu, Z.-J.; Tempel, W.; Doyle, R. J.; Rose, J. P.; Wang, B.-C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of lectin-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Cryst. D*, **2003**, *59* (7), 1241-1242.
- (25) Cioci, G.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Wimmerová, M.; Sudakevitz, D.; Pérez, S.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **2003**, *555* (2), 297-301.
- (26) Reynolds, M.; Pérez, S. Thermodynamics and chemical characterization of protein-carbohydrate interactions: The multivalency issue. *C. R. Chimie*, **2011**, *14* (1), 74-95.
- (27) Blanchard, B.; Imberty, A.; Varrot, A. Secondary sugar binding site identified for LecA lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins*, **2013**, *82* (6), 1060-1065.
- (28) Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C. Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2000**, *29* (1), 53-57.
- (29) Perret, S.; Sabin, C.; Dumon, C.; Pokorná, M.; Gautier, C.; Galanina, O.; Ilia, S.; Bovin, N.; Nicaise, M.; Desmadril, M. *et al.* Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-III of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **2005**, *389* (2), 325-332.
- (30) Wagner, S.; Hauck, D.; Hoffmann, M.; Sommer, R.; Joachim, I.; Müller, R.; Imberty, A.; Varrot, A.; Titz, A. Covalent Lectin Inhibition and Application in Bacterial Biofilm Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (52), 16559-16564.
- (31) Biedermann, F.; Schneider, H.-J. Experimental Binding Energies in Supramolecular Complexes. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (9), 5216-5300.
- (32) Bernardi, A.; Jimenez-Barbero, J.; Casnati, A.; De Castro, C.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K.-E.; Lahmann, M. *et al.* Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4709-4727.
- (33) Garber, N.; Guempel, U.; Gilboa-Garber, N.; Royle, R. J. Specificity of the fucose-binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **1987**, *48* (3), 331-334.
- (34) Sicard, D.; Cecioni, S.; Iazykov, M.; Chevolot, Y.; Matthews, S. E.; Praly, J.-P.; Souteyrand, E.; Imberty, A.; Vidal, S.; Phaner-Goutorbe, M. AFM investigation of *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA (PA-IL) filaments induced by multivalent glycoclusters. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (33), 9483-9485.
- (35) Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S. Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix[4]arene Glycoconjugates. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (47), 13232-13240.
- (36) Pertici, F.; Pieters, R. J. Potent divalent inhibitors with rigid glucose click spacers for *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (33), 4008-4010.
- (37) Pertici, F.; de Mol, N. J.; Kemmink, J.; Pieters, R. J. Optimizing Divalent Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA by Using A Rigid Spacer. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (50), 16923-16927.

- (38) Chabre, Y. M.; Giguère, D.; Blanchard, B.; Rodrigue, J.; Rocheleau, S.; Neault, M.; Rauthu, S.; Papadopoulos, A.; Arnold, A. A.; Imbert, A. *et al.* Combining Glycomimetic and Multivalent Strategies toward Designing Potent Bacterial Lectin Inhibitors. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (23), 6545-6562.
- (39) Kottari, N.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Rej, R.; Roy, R. Efficient and accelerated growth of multifunctional dendrimers using orthogonal thiol-ene and SN₂ reactions. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (16), 1983-1985.
- (40) Kadam, R. U.; Bergmann, M.; Garg, D.; Gabrieli, G.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. Structure-Based Optimization of the Terminal Tripeptide in Glycopeptide Dendrimer Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Targeting LecA. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (50), 17054-17063.
- (41) Kadam, R. U.; Garg, D.; Schwartz, J.; Visini, R.; Sattler, M.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. CH- π "T-Shape" Interaction with Histidine Explains Binding of Aromatic Galactosides to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (9), 1925-1930.
- (42) Kadam, R. U.; Bergmann, M.; Hurley, M.; Garg, D.; Cacciarini, M.; Swiderska, M. A.; Nativi, C.; Sattler, M.; Smyth, A. R.; Williams, P. *et al.* A Glycopeptide Dendrimer Inhibitor of the Galactose-Specific Lectin LecA and of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (45), 10631-10635.
- (43) Gening, M. L.; Titov, D. V.; Cecioni, S.; Audfray, A.; Gerbst, A. G.; Tsvetkov, Y. E.; Krylov, V. B.; Imbert, A.; Nifantiev, N. E.; Vidal, S. Synthesis of Multivalent Carbohydrate-Centered Glycoclusters as Nanomolar Ligands of the Bacterial Lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (28), 9272-9285.
- (44) Soomro, Z. H.; Cecioni, S.; Blanchard, H.; Praly, J.-P.; Imbert, A.; Vidal, S.; Matthews, S. E. CuAAC synthesis of resorcin[4]arene-based glycoclusters as multivalent ligands of lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (19), 6587-6597.
- (45) Cecioni, S.; Faure, S.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Parrot-Lopez, H.; Roy, O.; Tallefumier, C.; Wimmerová, M.; Praly, J.-P.; Imbert, A. *et al.* Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of "Clicked" Multivalent Glycoclusters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (7), 2146-2159.
- (46) Donnier-Maréchal, M.; Galanos, N.; Grandjean, T.; Pascal, Y.; Ji, D.-K.; Dong, L.; Gillon, E.; He, X.-P.; Imbert, A.; Kipnis, E. *et al.* Perylenediimide-based glycoclusters as high affinity ligands of bacterial lectins: synthesis, binding studies and anti-adhesive properties. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (47), 10037-10043.
- (47) Gerland, B.; Goudot, A.; Ligeour, C.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Vidal, S.; Gehin, T.; Vidal, O.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J. *et al.* Structure Binding Relationship of Galactosylated Glycoclusters toward *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (2), 379-392.
- (48) Wang, S.; Dupin, L.; Noël, M.; Carroux, C. J.; Renaud, L.; Géhin, T.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Vergoten, G. *et al.* Toward the Rational Design of Galactosylated Glycoclusters That Target *Pseudomonas aeruginosa* Lectin A (LecA): Influence of Linker Arms That Lead to Low-Nanomolar Multivalent Ligands. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (33), 11785-11794.
- (49) Buffet, K.; Nierengarten, I.; Galanos, N.; Gillon, E.; Holler, M.; Imbert, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Vincent, S. P.; Nierengarten, J.-F. Pillar[5]arene-Based Glycoclusters: Synthesis and Multivalent Binding to Pathogenic Bacterial Lectins. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (9), 2955-2963.
- (50) Galanos, N.; Gillon, E.; Imbert, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S. Pentavalent pillar[5]arene-based glycoclusters and their multivalent binding to pathogenic bacterial lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (13), 3476-3481.

- (51) Nierengarten, J.-F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Munoz, A.; Martin, N.; Rojo, J.; Sanchez-Navarro, M.; Cecioni, S. *et al.* Fullerene sugar balls. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (22), 3860-3862.
- (52) Cecioni, S.; Oerthel, V.; Iehl, J.; Holler, M.; Goyard, D.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Nierengarten, J.-F.; Vidal, S. Synthesis of Dodecavalent Fullerene-Based Glycoclusters and Evaluation of Their Binding Properties towards a Bacterial Lectin. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17 (11), 3252-3261.
- (53) Marotte, K.; Préville, C.; Sabin, C.; Moumé-Pymbock, M.; Imberty, A.; Roy, R. Synthesis and binding properties of divalent and trivalent clusters of the Lewis a disaccharide moiety to *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-IIL. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (18), 2953-2961.
- (54) Marotte, K.; Sabin, C.; Préville, C.; Moumé-Pymbock, M.; Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Imberty, A.; Roy, R. X-ray Structures and Thermodynamics of the Interaction of PA-IIL from *Pseudomonas aeruginosa* with Disaccharide Derivatives. *ChemMedChem* **2007**, 2 (9), 1328-1338.
- (55) Johansson, E. M. V.; Kolomiets, E.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. Combinatorial variation of branching length and multivalency in a large (390 625 member) glycopeptide dendrimer library: ligands for fucose-specific lectins. *New J. Chem.* **2007**, 31 (7), 1291-1299.
- (56) Johansson, E. M. V.; Crusz, S. A.; Kolomiets, E.; Buts, L.; Kadam, R. U.; Cacciarini, M.; Bartels, K.-M.; Diggle, S. P.; Cámara, M.; Williams, P. *et al.* Inhibition and Dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Glycopeptide Dendrimers Targeting the Fucose-Specific Lectin LecB. *Chem. Biol.* **2008**, 15 (12), 1249-1257.
- (57) Kolomiets, E.; Swiderska, M. A.; Kadam, R. U.; Johansson, E. M. V.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. Glycopeptide Dendrimers with High Affinity for the Fucose-Binding Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemMedChem*, **2009**, 4 (4), 562-569.
- (58) Johansson, E. M. V.; Kadam, R. U.; Rispoli, G.; Crusz, S. A.; Bartels, K.-M.; Diggle, S. P.; Cámara, M.; Williams, P.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T. *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a glycopeptide dendrimer containing D-amino acids. *MedChemComm*, **2011**, 2 (5), 418-420.
- (59) Berthet, N.; Thomas, B.; Bossu, I.; Dufour, E.; Gillon, E.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Imberty, A.; Dumy, P.; Renaudet, O. High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24 (9), 1598-1611.
- (60) Sommer, R.; Wagner, S.; Varrot, A.; Nycholat, C. M.; Khaledi, A.; Häussler, S.; Paulson, J. C.; Imberty, A.; Titz, A. The virulence factor LecB varies in clinical isolates: consequences for ligand binding and drug discovery. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (8), 4990-5001.
- (61) Sommer, R.; Wagner, S.; Rox, K.; Varrot, A.; Hauck, D.; Wamhoff, E.-C.; Schreiber, J.; Ryckmans, T.; Brunner, T.; Rademacher, C. *et al.* Glycomimetic, Orally Bioavailable LecB Inhibitors Block Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140 (7), 2537-2545.
- (62) Titz, A.; Sommer, R. Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* LecB 20180155310, **2018**.
- (63) Morvan, F.; Meyer, A.; Jochum, A.; Sabin, C.; Chevolot, Y.; Imberty, A.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E.; Vidal, S. Fucosylated Pentaerythrityl Phosphodiester Oligomers (PePOs): Automated Synthesis of DNA-Based Glycoclusters and Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin (PA-IIL). *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18 (5), 1637-1643.
- (64) Gerland, B.; Goudot, A.; Pourceau, G.; Meyer, A.; Dugas, V.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevolot, Y. *et al.* Synthesis of a Library of Fucosylated Glycoclusters and Determination of their Binding toward *Pseudomonas aeruginosa*

- Lectin B (PA-IIL) Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray. *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23 (8), 1534-1547.
- (65) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37 (20), 2754-2794.
- (66) Lee, R. T.; Lee, Y. C. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj. J.* **2000**, 17 (7), 543-551.
- (67) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (50), 14922-14933.
- (68) Gargano, J. M.; Ngo, T.; Kim, J. Y.; Acheson, D. W. K.; Lees, W. J. Multivalent Inhibition of AB5 Toxins. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (51), 12909-12910.
- (69) Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N. A Model for Describing the Thermodynamics of Multivalent Host-Guest Interactions at Interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (21), 6784-6797.
- (70) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature*, **2000**, 403, 669-672.
- (71) Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Brewer, C. F. Thermodynamics of Multivalent Carbohydrate-Lectin Cross-Linking Interactions: Importance of Entropy in the Bind and Jump Mechanism. *Biochemistry*, **2009**, 48 (18), 3822-3827.
- (72) Dam, T. K.; Brewer, C. F. Multivalent Lectin-Carbohydrate interactions : Energetics and Mechanisms of Binding In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; Horton, D., Ed.; Academic Press, 2010; Vol. 63, Chap. 5, pp. 139-164.
- (73) Cairo, C. W.; Gestwicki, J. E.; Kanai, M.; Kiessling, L. L. Control of Multivalent Interactions by Binding Epitope Density. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (8), 1615-1619.
- (74) Bertozzi, C. R.; Kiessling, Laura, L. Chemical Glycobiology. *Science*, **2001**, 291 (5512), 2357-2364.
- (75) Bray, D.; Levin, M. D.; Morton-Firth, C. J. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature*, **1998**, 393, 85-88.
- (76) Guiard, J.; Fiege, B.; Kitov, P. I.; Peters, T.; Bundle, D. R. "Double-Click" Protocol for Synthesis of Heterobifunctional Multivalent Ligands: Toward a Focused Library of Specific Norovirus Inhibitors. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17 (27), 7438-7441.
- (77) Sacchettini, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. Multivalent Protein-Carbohydrate Interactions. A New Paradigm for Supramolecular Assembly and Signal Transduction. *Biochemistry*, **2001**, 40 (10), 3009-3015.
- (78) Pierfausto, S.; Giorgio, F.; Vladimir, F.; Stanislav, M. The Effects of Combinatorial Chemistry and Technologies on Drug Discovery and Biotechnology – a Mini Review. *Nova Biotechnol. Chim.* **2014**, 13 (2), 87-108.
- (79) Gordon, E. M.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gallop, M. A. Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions. *J. Med. Chem.* **1994**, 37 (10), 1385-1401.
- (80) Newman, D. J. Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (9), 2589-2599.
- (81) Nicolaou, K. C.; Pfeifferkorn, J. A.; Barluenga, S.; Mitchell, H. J.; Roecker, A. J.; Cao, G. Q. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 3. The "Libraries from Libraries" Principle for Diversity Enhancement of Benzopyran Libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (41), 9968-9976.

- (82) Nicolaou, K. C.; Pfefferkorn, J. A.; Mitchell, H. J.; Roecker, A. J.; Barluenga, S.; Cao, G. Q.; Affleck, R. L.; Lillig, J. E. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 2. Construction of a 10 000-Membered Benzopyran Library by Directed Split-and-Pool Chemistry Using NanoKans and Optical Encoding. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (41), 9954-9967.
- (83) Nicolaou, K. C.; Pfefferkorn, J. A.; Roecker, A. J.; Cao, G. Q.; Barluenga, S.; Mitchell, H. J. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 1. General Principles and Solid-Phase Synthesis of Benzopyrans. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (41), 9939-9953.
- (84) Brown, D. G.; Boström, J. Where Do Recent Small Molecule Clinical Development Candidates Come From? *J. Med. Chem.* **2018**, DOI:10.1021/acs.jmedchem.8b00675.
- (85) Kinch, M. S.; Haynesworth, A.; Kinch, S. L.; Hoyer, D. An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827–2013. *Drug Discov. Today*, **2014**, *19* (8), 1033-1039.
- (86) Lehn, J.-M. Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5* (9), 2455-2463.
- (87) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 3652-3711.
- (88) Herrmann, A. Dynamic combinatorial/covalent chemistry: a tool to read, generate and modulate the bioactivity of compounds and compound mixtures. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1899-1933.
- (89) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. Selection and Amplification of Hosts From Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides. *Science*, **2002**, *297* (5581), 590-593.
- (90) Timmerman, P.; Verboom, W.; van Veggel, F. C. J. M.; van Hoorn, W. P.; Reinhoudt, D. N. An Organic Molecule with a Rigid Cavity of Nanosize Dimensions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33* (12), 1292-1295.
- (91) Crego Calama, M.; Timmerman, P.; N. Reinhoudt, D.; Crego Calama, M.; Hulst, R.; Timmerman, P.; Fokkens, R.; Nibbering, N. M. M. Libraries of non-covalent hydrogen-bonded assemblies; combinatorial synthesis of supramolecular systems. *Chem. Commun.* **1998**, (9), 1021-1022.
- (92) Hasenknopf, B.; Lehn, J.-M.; Boumediene, N.; Dupont-Gervais, A.; Van Dorsselaer, A.; Kneisel, B.; Fenske, D. Self-Assembly of Tetra- and Hexanuclear Circular Helicates. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (45), 10956-10962.
- (93) Black, S. P.; Wood, D. M.; Schwarz, F. B.; Ronson, T. K.; Holstein, J. J.; Stefankiewicz, A. R.; Schalley, C. A.; Sanders, J. K. M.; Nitschke, J. R. Catenation and encapsulation induce distinct reconstitutions within a dynamic library of mixed-ligand Zn₄L₆ cages. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (4), 2614-2620.
- (94) C. Try, A.; M. Harding, M.; C. Try, A.; M. Harding, M.; G. Hamilton, D.; K. M. Sanders, J. Reversible five-component assembly of a [2]catenane from a chiral metallomacrocyclic and a dinaphtho-crown ether. *Chem. Commun.* **1998**, (6), 723-724.
- (95) Nicolaou, K. C.; Hughes, R.; Cho, S. Y.; Winssinger, N.; Smethurst, C.; Labischinski, H.; Endermann, R. Target-Accelerated Combinatorial Synthesis and Discovery of Highly Potent Antibiotics Effective Against Vancomycin-Resistant Bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (21), 3823-3828.
- (96) Nicolaou, K. C.; Mitchell, H. J.; Jain, N. F.; Winssinger, N.; Hughes, R.; Bando, T. Total Synthesis of Vancomycin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *38*, 240-244.
- (97) Sarma, R. J.; Otto, S.; Nitschke, J. R. Disulfides, Imines, and Metal Coordination within a Single System: Interplay between Three Dynamic Equilibria. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (34), 9542-9546.

- (98) Drożdż, W.; Bouillon, C.; Kotras, C.; Richeter, S.; Barboiu, M.; Clément, S.; Stefankiewicz, A. R.; Ulrich, S. Generation of Multicomponent Molecular Cages using Simultaneous Dynamic Covalent Reactions. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (71), 18010-18018.
- (99) Belenguer, A. M.; Frišćić, T.; Day, G. M.; Sanders, J. K. M. Solid-state dynamic combinatorial chemistry: reversibility and thermodynamic product selection in covalent mechanosynthesis. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (4), 696-700.
- (100) Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J.-M.; Peng, L.; Goeldner, M. Dynamic Deconvolution of a Pre-Equilibrated Dynamic Combinatorial Library of Acetylcholinesterase Inhibitors. *ChemBioChem*, **2001**, *2* (6), 438-444.
- (101) Ramström, O.; Lehn, J.-M. Drug discovery by dynamic combinatorial libraries. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 26-36.
- (102) Eliseev, A. V.; Nelen, M. I. Use of Molecular Recognition To Drive Chemical Evolution. 1. Controlling the Composition of an Equilibrating Mixture of Simple Arginine Receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (5), 1147-1148.
- (103) Corbett, P. T.; Otto, S.; Sanders, J. K. M. What Are the Limits to the Size of Effective Dynamic Combinatorial Libraries? *Org. Lett.* **2004**, *6* (11), 1825-1827.
- (104) Moore, J. S.; Zimmerman, N. W. "Masterpiece" Copolymer Sequences by Targeted Equilibrium-Shifting. *Org. Lett.* **2000**, *2* (7), 915-918.
- (105) Grote, Z.; Scopelliti, R.; Severin, K. Adaptive Behavior of Dynamic Combinatorial Libraries Generated by Assembly of Different Building Blocks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (32), 3821-3825.
- (106) Corbett, P. T.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Competition between Receptors in Dynamic Combinatorial Libraries: Amplification of the Fittest? *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (26), 9390-9392.
- (107) Kearney, P. C.; Mizoue, L. S.; Kumpf, R. A.; Forman, J. E.; McCurdy, A.; Dougherty, D. A. Molecular recognition in aqueous media. New binding studies provide further insights into the cation- π interaction and related phenomena. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (22), 9907-9919.
- (108) Ngola, S. M.; Kearney, P. C.; Mecozzi, S.; Russell, K.; Dougherty, D. A. A Selective Receptor for Arginine Derivatives in Aqueous Media. Energetic Consequences of Salt Bridges That Are Highly Exposed to Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (6), 1192-1201.
- (109) Mondal, M.; Hirsch, A. K. H. Dynamic combinatorial chemistry: a tool to facilitate the identification of inhibitors for protein targets. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (8), 2455-2488.
- (110) Rideout, D. Self-assembling cytotoxins. *Science*, **1986**, *233* (4763), 561-563.
- (111) Sanders, J. K. M. *Pure Appl. Chem.* **2000**; *72*, 2265-2274.
- (112) Nguyen, I.; Huc, R. Optimizing the reversibility of hydrazone formation for dynamic combinatorial chemistry. *Chem. Commun.* **2003**, (8), 942-943.
- (113) Sindelar, M.; Wanner, K. T. Library Screening by Means of Mass Spectrometry (MS) Binding Assays—Exemplarily Demonstrated for a Pseudostatic Library Addressing γ -Aminobutyric Acid (GABA) Transporter 1 (GAT1). *ChemMedChem*, **2012**, *7* (9), 1678-1690.
- (114) R. L. Cousins, G.; Poulsen, S.-A.; K. M. Sanders, J. Dynamic combinatorial libraries of pseudo-peptide hydrazone macrocycles. *Chem. Commun.* **1999**, (16), 1575-1576.
- (115) Bhat, V. T.; Caniard, A. M.; Luksch, T.; Brenk, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. Nucleophilic catalysis of acylhydrazone equilibration for protein-directed dynamic covalent chemistry. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490-497.
- (116) Mondal, M.; Radeva, N.; Fanlo-Virgós, H.; Otto, S.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease

- Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (32), 9422-9426.
- (117) Mondal, M.; Radeva, N.; Köster, H.; Park, A.; Potamitis, C.; Zervou, M.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. Structure-Based Design of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin by Exploiting Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (12), 3259-3263.
- (118) Frei, P.; Pang, L.; Silberman, M.; Eriş, D.; Mühlethaler, T.; Schwardt, O.; Ernst, B. Target-directed Dynamic Combinatorial Chemistry: A Study on Potentials and Pitfalls as Exemplified on a Bacterial Target. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23 (48), 11570-11577.
- (119) Steudel, R. Properties of Sulfur-Sulfur Bonds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14 (10), 655-664.
- (120) Vial, L.; Ludlow, R. F.; Leclaire, J.; Pérez-Fernández, R.; Otto, S. Controlling the Biological Effects of Spermine Using a Synthetic Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (31), 10253-10257.
- (121) Skowron, P.-T.; Dumartin, M.; Jeamet, E.; Perret, F.; Gourlaouen, C.; Baudouin, A.; Fenet, B.; Naubron, J.-V.; Fotiadu, F.; Vial, L. *et al.* On-Demand Cyclophanes: Substituent-Directed Self-Assembling, Folding, and Binding. *J. Org. Chem.* **2016**, 81 (2), 654-661.
- (122) Cougnon, F. B. L.; Sanders, J. K. M. Evolution of Dynamic Combinatorial Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (12), 2211-2221.
- (123) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (48), 12063-12064.
- (124) Ingeman, L. A.; Cuellar, M. E.; Waters, M. L. A small molecule receptor that selectively recognizes trimethyl lysine in a histone peptide with native protein-like affinity. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (11), 1839-1841.
- (125) Leclaire, J.; Vial, L.; Otto, S.; Sanders, J. K. M. Expanding diversity in dynamic combinatorial libraries: simultaneous exchange of disulfide and thioester linkages. *Chem. Commun.* **2005**, (15), 1959-1961.
- (126) Scott, D. E.; Dawes, G. J.; Ando, M.; Abell, C.; Ciulli, A. A Fragment-Based Approach to Probing Adenosine Recognition Sites by Using Dynamic Combinatorial Chemistry. *ChemBioChem*, **2009**, 10 (17), 2772-2779.
- (127) Cancilla, M. T.; He, M. M.; Viswanathan, N.; Simmons, R. L.; Taylor, M.; Fung, A. D.; Cao, K.; Erlanson, D. A. Discovery of an Aurora kinase inhibitor through site-specific dynamic combinatorial chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (14), 3978-3981.
- (128) Donnier-Maréchal, M.; Septavaux, J.; Jeamet, E.; Héloin, A.; Perret, F.; Dumont, E.; Rossi, J.-C.; Ziarelli, F.; Leclaire, J.; Vial, L. Diastereoselective Synthesis of a Dyn[3]arene with Distinct Binding Behaviors toward Linear Biogenic Polyamines. *Org. Lett.* **2018**, 20 (8), 2420-2423.
- (129) Boukerb, A. M.; Rousset, A.; Galanos, N.; Méar, J.-B.; Thépaut, M.; Grandjean, T.; Gillon, E.; Cecioni, S.; Abderrahmen, C.; Faure, K. *et al.* Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *doi* Lung Infection. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (24), 10275-10289.
- (130) Newman, M. S.; Karnes, H. A. The Conversion of Phenols to Thiophenols via Dialkylthiocarbamates. *J. Org. Chem.* **1966**, 31 (12), 3980-3984.
- (131) Kwart, H.; Evans, E. R. The Vapor Phase Rearrangement of Thiocarbonates and Thiocarbamates. *J. Org. Chem.* **1966**, 31 (2), 410-413.
- (132) Gilday, J. P.; Lenden, P.; Moseley, J. D.; Cox, B. G. The Newman-Kwart Rearrangement: A Microwave Kinetic Study. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (8), 3130-3134.
- (133) Burns, M.; Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Renny, J. S. The Molecularity of the Newman-Kwart Rearrangement. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (19), 6347-6353.

- (134) Harvey, J. N.; Jover, J.; Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Murray, P.; Renny, J. S. The Newman–Kwart Rearrangement of *O*-Aryl Thiocarbamates: Substantial Reduction in Reaction Temperatures through Palladium Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7612-7615.
- (135) Perkowski, A. J.; Cruz, C. L.; Nicewicz, D. A. Ambient-Temperature Newman–Kwart Rearrangement Mediated by Organic Photoredox Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (50), 15684-15687.
- (136) Pedersen, S. K.; Ulfkjær, A.; Newman, M. N.; Yogarasa, S.; Petersen, A. U.; Sølling, T. I.; Pittelkow, M. Inverting the Selectivity of the Newman–Kwart Rearrangement via One Electron Oxidation at Room Temperature. *J. Org. Chem.* **2018**, DOI:10.1021/acs.joc.8b01800.
- (137) Eriksen, K.; Ulfkjær, A.; Sølling, T. I.; Pittelkow, M. Benzylic Thio and Seleno Newman–Kwart Rearrangements. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (18), 10786-10797.
- (138) Takagi, K. A facile synthesis of sulfides using *S*-aryl-isothiuronium intermediates. *Chem. Lett.* **1986**, *15* (8), 1379-1380.
- (139) Oderinde, M. S.; Frenette, M.; Robbins, D. W.; Aquila, B.; Johannes, J. W. Photoredox Mediated Nickel Catalyzed Cross-Coupling of Thiols With Aryl and Heteroaryl Iodides via Thiyl Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (6), 1760-1763.
- (140) Jiang, Y.; Qin, Y.; Xie, S.; Zhang, X.; Dong, J.; Ma, D. A General and Efficient Approach to Aryl Thiols: CuI-Catalyzed Coupling of Aryl Iodides with Sulfur and Subsequent Reduction. *Org. Lett.* **2009**, *11* (22), 5250-5253.
- (141) Xu, H.-J.; Liang, Y.-F.; Cai, Z.-Y.; Qi, H.-X.; Yang, C.-Y.; Feng, Y.-S. CuI-Nanoparticles-Catalyzed Selective Synthesis of Phenols, Anilines, and Thiophenols from Aryl Halides in Aqueous Solution. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (7), 2296-2300.
- (142) Demeter, D., Nouveaux systèmes conjugués fonctionnels dérivés du thiophène. Université d'Angers. **2008**. Français. <tel-00435521>.
- (143) Arnould, J. C.; Didelot, M.; Cadilhac, C.; Pasquet, M. J. Convenient synthesis of aromatic thiols from phenols. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (26), 4523-4524.
- (144) Lai, C.; Backes, B. J. Efficient preparation of *S*-aryl thioacetates from aryl halides and potassium thioacetate. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (17), 3033-3037.
- (145) Fernández-Rodríguez, M. A.; Hartwig, J. F. One-Pot Synthesis of Unsymmetrical Diaryl Thioethers by Palladium-Catalyzed Coupling of Two Aryl Bromides and a Thiol Surrogate. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (8), 2355-2359.
- (146) Kreis, M.; Bräse, S. A General and Efficient Method for the Synthesis of Silyl-Protected Arenethiols from Aryl Halides or Triflates. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 313-319.
- (147) Sevez, G.; Pozzo, J.-L. Toward multi-addressable molecular systems: Efficient synthesis and photochromic performance of unsymmetrical bisthienylethenes. *Dyes Pigm.* **2011**, *89* (3), 246-253.
- (148) Grunwell, J. R. Reaction of Grignard reagents with tetramethylthiuram disulfide yielding dithiocarbamates. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (5), 1500-1501.
- (149) Leuckart, R. *J. Prakt. Chem.* **1890**, *41*, 179-224.
- (150) Testaferri, L.; Tingoli, M.; Tiecco, M. Reactions of polychlorobenzenes with alkanethiol anions in HMPA. A simple, high-yield synthesis of poly(alkylthio)benzenes. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (22), 4376-4380.
- (151) Kishore, R. S. K.; Ravikumar, V.; Bernardinelli, G.; Sakai, N.; Matile, S. Rapid and Mild Synthesis of Functionalized Naphthalenediimides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (2), 738-740.
- (152) Pummerer, R. Über Phenyl-sulfoxyessigsäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42* (2), 2282-2291.

- (153) Pinchart, A.; Dallaire, C.; Van Bierbeek, A.; Gingras, M. Efficient formation of aromatic thiols from thiomethylated precursors. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 (30), 5479-5482.
- (154) Belle, C.; Bougault, C.; Averbuch, M.-T.; Durif, A.; Pierre, J.-L.; Latour, J.-M.; Le Pape, L. Paramagnetic NMR Investigations of High-Spin Nickel(II) Complexes. Controlled Synthesis, Structural, Electronic, and Magnetic Properties of Dinuclear vs Mononuclear Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (33), 8053-8066.
- (155) Kimura, T.; Amano, K.; Namauo, T. Preparation of Phthalocyaninato and Porphyrinato Titanium (IV) Benzenedichalcogenolates. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2011**, 186 (5), 1234-1237.
- (156) Lawson, L.; Huser, T. Synthesis and Characterization of a Disulfide Reporter Molecule for Enhancing pH Measurements Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (8), 3574-3580.
- (157) Miros, F. N.; Zhao, Y.; Sargsyan, G.; Pupier, M.; Besnard, C.; Beuchat, C.; Mareda, J.; Sakai, N.; Matile, S. Enolate Stabilization by Anion- π Interactions: Deuterium Exchange in Malonate Dilactones on π -Acidic Surfaces. *Chem. Eur. J.* **2015**, 22 (8), 2648-2657.
- (158) Akamatsu, M.; Sakai, N.; Matile, S. Electric-Field-Assisted Anion- π Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (19), 6558-6561.
- (159) Zhao, Y.; Huang, G.; Besnard, C.; Mareda, J.; Sakai, N.; Matile, S. Big, Strong, Neutral, Twisted, and Chiral π Acids. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21 (16), 6202-6207.
- (160) Liu, L.; Cotellet, Y.; Avestro, A.-J.; Sakai, N.; Matile, S. Asymmetric Anion- π Catalysis of Iminium/Nitroaldol Cascades To Form Cyclohexane Rings with Five Stereogenic Centers Directly on π -Acidic Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (25), 7876-7879.
- (161) Thompson, A. C.; Grimm, H. M.; Gray Bé, A.; McKnight, K. J.; Reczek, J. J. Efficient Bromination of Naphthalene Dianhydride and Microwave-Assisted Synthesis of Core-Brominated Naphthalene Diimides. *Synth. Commun.* **2015**, 45 (9), 1127-1136.
- (162) Cao, D.; Hong, M.; Blackburn, A. K.; Liu, Z.; Holcroft, J. M.; Stoddart, J. F. Two-point halogen bonding between 3,6-dihalopyromellitic diimides. *Chem. Sci.* **2014**, 5 (11), 4242-4248.
- (163) Oscarson, S. The Chemist's Way to Synthesize Glycosides In *The Sugar Code*; Gabius, H.-J., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2009**, chap. 3, pp. 31-51.
- (164) Cecioni, S.; Praly, J.-P.; Matthews, S. E.; Wimmerová, M.; Imberty, A.; Vidal, S. Rational Design and Synthesis of Optimized Glycoclusters for Multivalent Lectin-Carbohydrate Interactions: Influence of the Linker Arm. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18 (20), 6250-6263.
- (165) Cecioni, S.; Almant, M.; Praly, J.-P.; Vidal, S. Synthesis of Azido-Functionalized Carbohydrates for the Design of Glycoconjugates In *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods*; Kováč, P., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **2012**; 1, Chap. 18, pp. 175-180.
- (166) Szurmai, Z. S., L.; Liptak, A. *Acta Chim. Hung.* **1989**, 126, 259.
- (167) Chevolot, Y.; Bouillon, C.; Vidal, S.; Morvan, F.; Meyer, A.; Cloarec, J.-P.; Jochum, A.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Souteyrand, E. DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (14), 2398-2402.
- (168) Schmalisch, S.; Mahrwald, R. Organocatalyzed Direct Glycosylation of Unprotected and Unactivated Carbohydrates. *Org. Lett.* **2013**, 15 (22), 5854-5857.
- (169) Wang, S.; Galanos, N.; Rousset, A.; Buffet, K.; Cecioni, S.; Lafont, D.; Vincent, S. P.; Vidal, S. Fucosylation of triethyleneglycol-based acceptors into 'clickable' α -fucosides. *Carbohydr. Res.* **2014**, 395, 15-18.

- (170) Ramström, O.; Lohmann, S.; Bunyapaiboonsri, T.; Lehn, J.-M. Dynamic Combinatorial Carbohydrate Libraries: Probing the Binding Site of the Concanavalin A Lectin. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10* (7), 1711-1715.
- (171) Ramström, O.; Lehn, J.-M. In Situ Generation and Screening of a Dynamic Combinatorial Carbohydrate Library against Concanavalin A. *ChemBioChem*, **2000**, *1* (1), 41-48.
- (172) Pei, Z.; Larsson, R.; Aastrup, T.; Anderson, H.; Lehn, J.-M.; Ramström, O. Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for rapid identification of glycosyldisulfide lectin inhibitors from a dynamic combinatorial library. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22* (1), 42-48.
- (173) Reeh, P.; de Mendoza, J. Dynamic Multivalency for Carbohydrate-Protein Recognition through Dynamic Combinatorial Libraries Based on Fe^{II}-Bipyridine Complexes. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (17), 5259-5262.
- (174) Sigma-Aldrich,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/17647?lang=fr®ion=FR>
(accessed Oct 19, **2018**).
- (175) Wong, D. T.-M.; Marvel, C. S. Aromatic polyethers, polysulfones, and polyketones as laminating resins. VIII. Aryl disulfide units as crosslinking agents. *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **1976**, *14* (7), 1637-1644.
- (176) Raasch, M. S. A macrocyclic tetradisulfide from tetrafluoro-1,4-benzenedithiol. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (15), 2629-2632.
- (177) Sonawane, M. P.; Jacobs, J.; Thomas, J.; Van Meervelt, L.; Dehaen, W. Synthesis and structural exploration of disulfide bridged [2n] pillararene-like molecules. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (56), 6310-6312.
- (178) Jeamet, E.; Septavaux, J.; Héloin, A.; Donnier-Maréchal, M.; Dumartin, M.; Ourri, B.; Mandal, P.; Huc, I.; Bignon, E.; Dumont, E. *et al.* Wetting the lock and key enthalpically favours polyelectrolyte binding. *Chem. Sci.* **2018**, DOI:10.1039/C8SC02966K.
- (179) Vial, L.; Dumartin, M.; Donnier-Maréchal, M.; Perret, F.; Francoia, J.-P.; Leclaire, J. Chirality sensing and discrimination of lysine derivatives in water with a dyn[4]arene. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (99), 14219-14221.
- (180) Collins, M. S.; Carnes, M. E.; Nell, B. P.; Zakharov, L. N.; Johnson, D. W. A facile route to old and new cyclophanes via self-assembly and capture. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11052-11059.
- (181) Whitney, A. M.; Ladame, S.; Balasubramanian, S. Templated Ligand Assembly by Using G-Quadruplex DNA and Dynamic Covalent Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (9), 1143-1146.
- (182) Kuhnert, N.; Rossignolo, G. M.; Lopez-Periago, A. The synthesis of trianglimines: on the scope and limitations of the [3 + 3] cyclocondensation reaction between (1R,2R)-diaminocyclohexane and aromatic dicarboxaldehydes. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (7), 1157-1170.
- (183) Okada, Y.; Sugai, M.; Chiba, K. Hydrogen-Bonding-Induced Fluorescence: Water-Soluble and Polarity-Independent Solvatochromic Fluorophores. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (22), 10922-10929.

Conclusion Générale

Au cours de cette étude, les synthèses de briques moléculaires capables de s'auto-assembler dans des conditions biocompatibles et possédant un ou plusieurs épitopes des lectines ont été décrites. Quatre noyaux aromatiques dithiolés ont été sélectionnés comme cibles pour une application en CCD. Quatre saccharides (galactose, fucose, mannose, glucose) ont été sélectionnés comme épitopes des lectines LecA et LecB de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que de ConA.

La première partie de notre étude a porté sur la synthèse des diverses briques moléculaires possédant un noyau aromatique distinct. La synthèse des dérivés 1,4-dithiophénol mono- et divalents a été couronnée de succès avec comme étape clé le réarrangement de Newman-Kwart pour l'introduction du dithiol. Les synthèses des composés naphthalène diimide et pyroméllitique n'ont pas encore abouti. L'introduction des groupements fonctionnels thiol via une réaction de S_NAr est maîtrisée pour la brique naphthalène mais la saponification des esters reste problématique. Pour les composés pyroméllitiques, l'introduction du cycle n'a pas encore été maîtrisée avec un groupement thiol déprotégeable. Néanmoins, via les composés 1,4-dithiophénols, nous avons à notre disposition dix briques moléculaires porteuses ou non d'épitopes saccharidiques des lectines.

La deuxième partie de cette thèse a concerné l'étude en chimie combinatoire dynamique des 10 synthons précédemment synthétisés. Une suroxydation des thiols en acide sulféniques et sulfiniques ainsi qu'une cyclisation intramoléculaire S-N lors de l'oligomérisation a été observée. Un criblage des conditions d'équilibration a déterminé que l'oligomérisation effectuée dans un tampon Tris/HCl, à pH 7.4, à 4°C et sans agitation permettait de ralentir fortement cette suroxydation, celle-ci n'apparaissant qu'après 20 jours d'équilibration. Un système modèle pour travailler en présence de lectine a été développé avec ConA.

Il a été observé qu'une chimiothèque ne contenant que la brique mannose divalente **M** et menant à la formation exclusive des dynarènes **M**₃ et **M**₄ n'était pas modifiée par l'ajout de la lectine. Ce résultat peut s'expliquer par la forte valence des deux dynarènes (hexa- et octavalent). Une affinité trop proche des cyclooligomères pour ConA amène à des amplifications non-détectables par HPLC. Pour pallier à ce problème, des chimiothèques combinatoires mixtes entre les briques mannose **M** et fucose **F** ont été générées donnant une distribution d'espèces contenant tous les homo- et hétérodyn[3,4]arènes. En présence de ConA, une dissociation des hétérodynarènes pour restaurer les homodynarènes est observée, validant la forte affinité des composés mannosylés pour ConA.

Une purification par HPLC semi-préparative a permis l'isolement des dyn[3]- et dyn[4]arènes. Malencontreusement, ces derniers isomérisent durant le traitement pour régénérer une distribution 1/1 entre les deux macrocycles. Ce mélange a tout de même été étudié en ITC avec ConA et un K_d nanomolaire a été obtenu, venant conforter les résultats observés en CCD. La démonstration de notre méthodologie sur ConA ayant été établie, nous l'appliquons actuellement aux lectines de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dynasweet. Les glycodyn[n]arènes comme ligands multivalents de lectines : Une étude par chimie combinatoire dynamique

De nombreux glycoclusters multivalents des calixarènes, des pillararènes ou des fullerènes ont été synthétisés au sein de notre laboratoire et ont montré d'excellentes affinités pour diverses lectines grâce à leur multivalence et au « glycoside cluster effect ». Nous avons cherché à approfondir ces résultats en ajoutant un degré de dynamisme à ces molécules. Pour cela, nous avons appliqué les concepts de la chimie combinatoire dynamique où des briques moléculaires s'auto-assemblent via des liaisons réversibles pour générer à l'équilibre thermodynamique une chimiothèque d'oligomères.

Des briques moléculaires dithiophénols glycosylés sont capables de s'auto-assembler via la formation de ponts disulfures. Leurs propriétés ont été investiguées en chimie combinatoire dynamique et la distribution d'espèces résultant de l'équilibration a montré la formation exclusive des cyclotrimères et cyclotétramères, ou dyn[3]- et dyn[4]arènes. La répétition de l'expérience en présence d'une lectine modèle (ConA) a mené à l'amplification des homodyn[3]- et homodyn[4]arènes. Ces derniers ont été isolés par HPLC semi-préparative et leurs affinités pour ConA ont été mesurées en ITC dans le domaine du nanomolaire. Une extension de cette méthodologie aux lectines LecA et LecB de *Pseudomonas aeruginosa* est en cours.

Mots-clés : Chimie combinatoire dynamique, Dynarènes, *Pseudomonas aeruginosa*, Multivalence, Glycocluster, Lectines, Concanavaline A.

Dynasweet. Glycodyn[n]arènes as multivalent lectin ligands : The sweet side of dynamic combinatorial chemistry

Several glycoclusters based on calixarenes, pillararenes or fullerenes have been synthesized in our laboratory. They exhibited strong affinities for several lectins through their multivalence and the "glycoside cluster effect". The purpose of this study was to add a dynamic part to these molecules. We therefore applied the concept of dynamic combinatorial chemistry in which building blocks are able to self-assemble through reversible bonds to generate a library of oligomers.

Dithiophenols bearing carbohydrate epitopes can self-assemble through the formation and exchange of disulfide bonds. Their properties in dynamic combinatorial chemistry were studied and the species distribution at the thermodynamic equilibrium revealed the selective formation of cyclotrimers and cyclotetramers named dyn[3]- and dyn[4]arenes. The equilibration in the presence of ConA, used as a model lectin, have led to the amplification of homodyn[3]- and homodyn[4]arenes. These glycodyn[n3,4]arenes have been isolated and their affinities toward ConA measured by ITC in the nanomolar range. Extension of this methodology toward the lectins LecA and LecB of *Pseudomonas aeruginosa* is in progress.

Keywords : Dynamic combinatorial chemistry, Dynarenes, *Pseudomonas aeruginosa*, Multivalence, Glycocluster, Lectins, Concanavalin A.