



Conception et synthèse d'hétéroglycoclusters pour l'immunothérapie anticancéreuse

Baptiste Thomas

► **To cite this version:**

Baptiste Thomas. Conception et synthèse d'hétéroglycoclusters pour l'immunothérapie anticancéreuse. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2014. Français. <NNT : 2014GRENV037>. <tel-01174880>

HAL Id: tel-01174880

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01174880>

Submitted on 10 Jul 2015

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Baptiste THOMAS

Thèse dirigée par **Olivier Renaudet**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Conception et synthèse d'hétéroglycoclusters pour l'immunothérapie anticancéreuse

Thèse soutenue publiquement le **10 décembre 2014**,
devant le jury composé de :

Mr. David BONNAFFE

Professeur, Université Paris-Sud XI, Rapporteur

Mr. Franck FIESCHI

Professeur, CEA Grenoble, Président

Mr. Sébastien GOUIN

Chargé de recherche, Université de Nantes, Rapporteur

Mme. Cristina NATIVI

Professeure, Université de Florence, Membre

Mr. Olivier RENAUDET

Professeur, Université de Grenoble, Membre



Introduction	11
I. Préambule	11
II. Les antigènes osidiques tumoraux	12
II.A. Les glycoprotéines	12
II.B. Les glycosphingolipides.....	13
III. Comment induire une réponse immunitaire contre le cancer ?	15
1. Les cellules du système immunitaire	15
III.A. Réponse T-cell indépendante	16
III.B. Réponse T-cell dépendante.....	17
IV. Comment concevoir un vaccin anti-tumoral ?	19
V. Approche semi-synthétique	20
1. Protéine porteuse	20
V.A. Vaccins comportant la séquence répétitive MUC-1	26
V.B. Utilisation de TACA artificiels.....	31
V.C. Virus-Like Particles (VLP).....	34
V.D. Liposome	36
V.E. Rhamnose.....	38
V.F. Polysaccharides zwitterioniques (ZPS).....	40
V.G. Inconvénients de l'approche semi-synthétique	41
VI. Approche synthétique	41
1. Vaccins synthétiques à deux composants.....	42
VI.A. Vaccins synthétiques à trois composants	53
VII. Travaux antérieurs du laboratoire	54
1. Plate-forme « RAFT ».....	54
VII.A. Vaccins synthétiques à deux composants	55
VII.B. Vaccins synthétiques à quatre composants	56
VIII. Notre projet.....	57
Chapitre II Synthèse d'homoglycoclusters tétravalents	60
A. Stratégie de synthèse des glycoconjugués	60
1. Approche classique	60
I.A. Approches chimiosélectives.....	61
II. Synthèse des motifs osidiques modifiés	70

1. Méthodologies de synthèse de sucres propargylés.....	70
II.A. Synthèse de l'antigène Tn en série propargylée	71
II.B. Synthèse de l'antigène TF en série propargylée	77
III. Préparation des plateformes complémentaires	80
1. Préparation de plateforme multivalente « aldéhyde ».....	80
III.A. Préparation de plateforme multivalente « azoture ».....	82
III.B. Préparation de plateforme multivalente « Aloc ».....	83
III.C. Préparation de plateforme multivalente « chloro-acétyle ».....	83
IV. Stratégie d'assemblage chimiosélective d'homoglycoclusters tétravalents.....	84
1. Ligation oxime	84
IV.A. Ligation CuAAc	85
IV.B. Ligation TEC.....	86
IV.C. Ligation TCC.....	86
V. Construction des candidats vaccins tétravalents	87
VI. Construction de vaccin tétravalent utilisant un mime de TACA	90
Chapitre III Synthèse d'homoglycoclusters de haut poids moléculaire.....	93
A. Assemblage des homoglycoclusters hexadécavalents.....	94
1. Stratégies de synthèse de glycodendrimères	94
I.A. Travaux du laboratoire	94
I.B. Synthèse des châssis hexadécavalents « aldéhyde ».....	95
I.C. Synthèse des châssis hexadécavalents « azoture ».....	97
I.D. Assemblage par ligation oxime.....	98
I.E. Assemblage par ligation CuAAc	99
I.F. Etude des propriétés biologiques des homoglycoclusters hexadécavalents	101
I.G. Construction des candidats vaccins hexadécavalents	105
II. Assemblage des homoglycoclusters 64-valents	108
1. Synthèse et caractérisation du châssis 64-valents	108
II.A. Etude structurale	114
II.B. Etude biologique	115
Chapitre IV Synthèse d'hétéroglycoclusters de taille variable	117
A. Les hétéroglycoclusters	117
1. Structures de faible densité	118
I.A. Structures de haute densité.....	122

II. Travaux antérieurs du laboratoire.....	125
III. Systèmes de faible densité.....	126
1. Série 2 + 2	126
III.A. Série 3 + 1.....	129
III.B. Série 4 + 2.....	131
III.C. Série 4 x 1	134
IV. Structures de haute densité.....	141
1. Série 8 + 8	141
IV.A. Série 4 x 4.....	149
IV.B. Construction des candidats vaccins à base d'hétéroclusters	150
Chapitre V Conclusion et perspectives	153
Chapitre VI Partie Experimentale	156
I. Materials and equipments	156
I.A. Reagents	156
I.B. Equipments.....	156
II. General procedures for peptides syntheses.....	157
II.A. Syntheses of linear protected peptides by SPPS: <i>Procedure A</i>	157
II.B. Cleavage on the resin: <i>Procedure B</i>	158
II.C. Cyclization reactions: <i>Procedure C</i>	159
II.D. Cleavage of protecting group N-ε: <i>Procedure D</i>	159
II.E. Oxidative cleavage: <i>Procedure E</i>	159
III. General procedures for chemoselective ligation	159
III.A. Oxime ligation (OL): <i>Procedure F</i>	159
III.B. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC): <i>Procedure G</i>	160
III.C. Thiol-ene coupling (TEC): <i>Procedure H</i>	160
III.D. Thiol-Chloroacetyl coupling (TCC): <i>Procedure I</i>	160
IV. Carbohydrate syntheses.....	161
V. Building block syntheses.....	169
VI. Glycopeptides syntheses	171
VI.A. Homoclusters.....	171
VI.B. Heteroclusters.....	192
Chapitre VII Bibliographie.....	214

Publications

B. Thomas, M. Fiore, I. Bossu, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of heteroglycoclusters using orthogonal chemoselective ligations. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, 8, 421-427.

M. Fiore, **B. Thomas**, V. Duléry, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of multi-antigenic platforms as vaccine candidates against cancers. *New J. Chem.*, **2013**, 37, 286-289.

B. Thomas, N. Berthet, J. Garcia, P. Dumy, O. Renaudet. Expanding the scope of oxime ligation: facile synthesis of large cyclopeptide-based glycodendrimers. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 10796-10798. [HOT ChemComm articles]

N. Berthet, **B. Thomas**, I. Bossu, E. Dufour, E. Gillon, J. Garcia, N. Spinelli, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet. High affinity glycodendrimers for the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioconjugate Chem.*, **2013**, 24, 1598-1611.

M. Fiore, **B. Thomas**, P. Dumy, O. Renaudet. Chemical methods for the synthesis of carbohydrate-based vaccines against cancers. Book Chapter in *Biomaterials for Cancer Therapeutics*, Editor K. Park, Woodhead Publishing, **2013**.

I. Bossu, **B. Thomas**, R. Roy, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of a multivalent glycocyclopeptide using oxime ligation. Book Chapter in *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods*, Vol. 2, Editor P. Kovac, CRC Press, Taylor & Francis Group, **2013**.

M. Fiore, G. C. Daskhan, **B. Thomas**, O. Renaudet. Orthogonal dual thiol-chloroacetyl and thiol-ene couplings for the sequential one-pot assembly of heteroglycoclusters. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, 10, 1557-1563.

M. Fiore, **B. Thomas**, G. C. Daskhan, O. Renaudet. Synthetic vaccines against cancers. Book Chapter in *Carbohydrates Chemistry: state-of-the-art and challenges for drug development*, Editor L. Cipolla, Imperial College Press, in press.

G. C. Daskhan, N. Berthet, **B. Thomas**, M. Fiore, O. Renaudet. Multivalent glycopeptides: toward nano-sized glycostructures. *Carbohydrate Research*, DOI: 10.1016/j.carres.2014.07.017

B. Richichi, **B. Thomas**, M. Fiore, R. Bosco, H. Qureshi, C. Nativi, O. Renaudet, L. BenMohamed. Clustered Tn-antigen mimetic-based cancer therapeutic vaccine induces strong antibody-mediated protective immunity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 11917-11920.

B. Thomas, M. Fiore, G. C. Chand, N. Spinelli, O. Renaudet. A multi-ligation strategy for the synthesis of heterofunctionalized glycosylated scaffolds. *Chem. Commun.*, **2014**, DOI: 10.1039/c4cc05451b

Communications orales et posters

B. Thomas, M. Fiore, I. Bossu, P. Dumy, O. Renaudet. Conception et synthèse d'hétéroglycoclusters pour l'immunothérapie anticancéreuse. *Journée Rhône-Alpes des Biomolécules*, Lyon (France), May **2011**. (Poster)

B. Thomas, M. Fiore, P. Dumy, O. Renaudet. Synthèse d'hétéroglycoclusters comme plates-formes pour la construction de candidats vaccins antitumoraux. *Journée Scientifique ARC 1 – Santé*, l'Isle d'Abeau (France), September **2012**. (Poster)

B. Thomas, **M. Fiore**, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of hetero-glycoclusters as platforms for vaccines candidates. *XIII^e Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati*, Pontignano (Italy), June **2012**. (Oral presentation)

B. Thomas, M. Fiore, P. Dumy, O. Renaudet. Synthèse de glycoclusters de haut poids moléculaire par ligation oxime. *Journée Rhône-Alpes des Biomolécules*, Grenoble (France), May **2012**. (Oral presentation)

M. Fiore, B. Thomas, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of hetero-glycoclusters as new platforms for the construction of anticancer vaccine candidates. *26th International Carbohydrate Symposium*, Madrid (Spain), July **2012**. (Oral presentation and poster)

B. Thomas, M. Fiore, P. Dumy, O. Renaudet. Assemblage chimiosélectif et évaluation biologique de glycoconjugués multivalents. *Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences*, Lyon (France), November **2012**. (Oral presentation)

B. Thomas, M. Fiore, P. Dumy, O. Renaudet. Conception et synthèse d'hétéro-glycoclusters pour l'immunothérapie anticancéreuse. *Groupe Français des Peptides et Proteines*, Sète (France), May **2013**. (Poster)

B. Thomas, N. Berthet, P. Dumy, **O. Renaudet**. Extending the scope of oxime ligation: synthesis of large cyclopeptide-based glycodendrimers and binding assays with lectins. COST Workshop-CM1102, Prague (Czech Republic), April 2013. (Poster)

M. Fiore, B. Thomas, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of homo- and hetero-glycoclusters as synthetic vaccines against cancers. *European Young Investigator Workshop "Deciphering the glycome: from synthesis to applications"*, Postdam/Berlin (Germany), March **2013**. (Oral presentation)

B. Thomas, M. Fiore, G. C. Daskhan, O. Renaudet. Controlled synthesis of cyclopeptide-based heteroglycoclusters using orthogonal chemoselective ligations. *27th International Carbohydrate Symposium*, Bangalore (India), January **2014**. (Oral presentation)

Abréviations et acronymes

Å	Angström	ITC	Isothermal titration calorimetry
Ac	Acétyle	K_a	Constante d'association
AcOEt	Acétate d'éthyle	K_d	Constante de dissociation
AcOH	Acide acétique	KLH	Keyhole limpet hemocyanin
Ac₂O	Anhydride acétique	MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
ADCC	Antibody-dependant cellular cytotoxicity		Méthanol
ADN	Acide desoxyribonucléique	MeOH	
Aloc	Allyloxy-carbonyle	NHS	
APC	Cellules Présentatrices d'antigènes	ou HOSuc	N-Hydroxysuccinimide
BCR	Récepteur B-cell	NK	Natural Killer
Boc	Tertiobutyloxycarbonyle	nm	Nanomètre
BF₃.OEt₂	Boron trifluoride diethyl etherate	NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
Bn	Benzyle	NPys	3-nitro-2-pyridinesulfonyl
BnBr	Bromure de benzyle	OL	Oxime Ligation
BSA	Bovine serum albumin	PEG	Polyéthylène-glycol
C_{ar.}	Carbones aromatiques	ppm	Partie par million
CCM	Chromatographie sur couche mince	PyBOP[®]	(benzotriazol-1-yl-oxy)tris (pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
CDC	Complement dependant cytotoxicity		
CFA	Adjuvant de Freund	RAFT	Regioselectively addressable functionalized template
CH₂Cl₂	Dichlorométhane		
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	RMN	Résonance magnétique nucléaire
ConA	Concanavaleine A	SM (ESI)	Spectrométrie de masse (ionisation par électrospray)
CTL	Lymphocyte T cytotoxique	SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
CuAAC	Copper Catalysed Azide-Alkyne Cycloadditions	TF	Résidu Gal-β1-3-GalNAc
DAST	Trifluorure de diéthylaminosulfure	t.a	Température ambiante
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	TCA	Trichloroacétimide
		tBu	tertiobutyle
DCC	N,N-dicyclohexylcarbodiimide	TACA	Tumor-associated Carbohydrate Antigens
Dde	1(4,4diméthyl)2,6 dioxocyclohexylidene)éthyle	TCC	Thiol-chloroacetyl coupling
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine	TEC	Thiol-ene coupling
DMF	N,N-Diméthylformamide	TFA	Acide trifluoroacétique
DMSO	Diméthylsulfoxyde	THF	Tétrahydrofurane
DPAP	2,2-diméthoxy-2-phenyl-acetophenone	THPTA	Tris-(3-hydroxypropyl-triazolyméthyl)amine
ELLA	Enzyme-linked lectin assays	TIS	Triisopropylsilane
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays	TLR	Toll-like receptors
éq.	Equivalent molaire	TMSOTf	Triméthylsilyl trifluoromethanesulfonate
Et₂O	Ether éthylique	Tn	Résidu GalNAc
Et₃N	Triéthylamine	TNBS	Acide trinitrobenzène sulfonique
EtOH	Ethanol	TOCSY	Total correlated spectroscopy
Fmoc	9-Fluorénylméthoxycarbonyle	TOF	Time-of-flight mass spectrometry
GCOSY	Gradient correlation spectrometry	TTox	Tetanus toxoid
GSL	Glycosphingolipides	t_R	Temps de rétention
H_{ar.}	Protons aromatiques	UEA	Ulex Europeus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole	UH	Unité d'hémagglutination
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance	UV	Ultraviolet
Ig	Immunoglobuline	VLP	Virus-like particles
IRM	Imagerie par résonance magnétique	ZPS	Polysaccharide zwitterionique
		λ	Longueur d'onde

Introduction

I. Préambule

Malgré les progrès spectaculaires réalisés ces dernières années en matière de prévention, diagnostique et traitement, le cancer reste un problème majeur de santé publique dans le monde. Selon l'ACS (American Cancer Society), le cancer est la seconde cause de mortalité dans les pays économiquement développés et la troisième dans les pays en développement.^[1] En effet, rien que en 2008, plus de 12,7 millions de nouveaux cas ont été recensés dans le monde et près de 7,6 millions de personnes ont perdu leur combat face au cancer. Les prédictions sont encore plus alarmistes, puisque 27 millions de nouveaux cas pourraient apparaître d'ici à 2050. Les méthodes traditionnelles pour lutter contre le cancer sont la chimiothérapie, les radiations ionisantes et la chirurgie. Alors que d'importantes avancées ont été réalisées dans ces domaines durant ces dernières décennies, le cancer reste malgré tout excessivement difficile à traiter.

L'immunothérapie anti-tumorale s'est développée plus récemment et offre une alternative très prometteuse pour lutter contre le cancer. Le but de cette stratégie est d'activer l'immunité du patient afin d'induire l'élimination de la tumeur. La stimulation d'une réponse immunitaire passe par des mécanismes extrêmement complexes et peut être réalisée principalement selon deux grandes approches. La première, nommée immunité passive est une méthode curative qui consiste par exemple à apporter à un individu atteint, des anticorps d'un autre individu ou d'un animal qui à déjà lutté contre l'antigène (sérothérapie). L'immunité active quant à elle comprend les vaccins prophylactiques qui permettent de stimuler l'immunité d'un individu en prévention, avant l'apparition de symptômes. On peut également inclure dans cette catégorie les vaccins thérapeutiques qui ont pour but d'agir en complément d'un autre traitement. En effet, lors d'une ablation tumorale par exemple, le geste chirurgical peut provoquer le relargage des cellules cancéreuses qui pourraient atteindre d'autres organes pour y proliférer. Les vaccins thérapeutiques pourraient éviter ces problèmes en éduquant le système immunitaire à reconnaître puis détruire les cellules cancéreuses. Plus d'une centaine d'essais cliniques basés sur cette approche ont été lancés récemment et plusieurs vaccins ont été commercialisés. Par exemple, le vaccin thérapeutique Provenge® a été approuvé en 2010 par la FDA (*Food and Drug Administration*) aux Etats-Unis pour lutter contre le cancer de la prostate. Bien que prometteurs, ces vaccins ne font qu'augmenter l'espérance de vie des patients de quelques mois et nécessitent donc des optimisations pour améliorer leur efficacité. L'utilisation de vaccins chimiques peut offrir des perspectives

thérapeutiques prometteuses. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail de thèse a été de développer de méthodologies de synthèse pour accéder à de nouvelles générations de vaccins chimiques antitumoraux.

II. Les antigènes osidiques tumoraux

Le développement de vaccins antitumoraux capables de combattre efficacement et spécifiquement les cellules cancéreuses grâce au système immunitaire, implique une conception particulièrement minutieuse. Tout d'abord, les sucres exposés à la surface cellulaire où ils sont associés à des protéines et aux lipides membranaires par liaison covalente (*Figure 1*), constituent une cible structurale de choix.

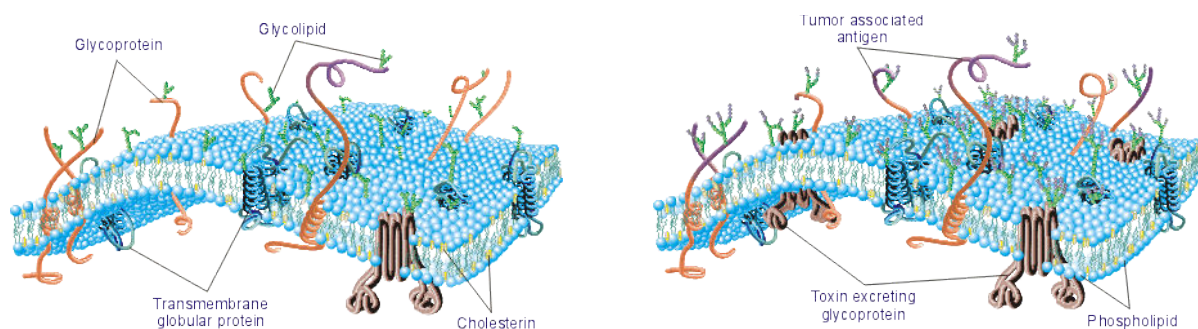


Figure 1 : Différentes classes de glycanes membranaires

En effet, la surface des tumeurs se distingue de celle des cellules saines par des glycosylations dites « aberrantes », correspondant souvent à des surexpressions de motifs osidiques déjà existants ou à l'apparition de structures inhabituelles, qu'on appelle *Tumor-Associated Carbohydrate Antigens* (TACA). Ces structures anormales peuvent être associées à de nombreux types de cancer (sein, colon, poumon, prostate, ovaire, mélanome...) tandis qu'elles ne sont pas exprimées ou masquées dans les tissus normaux correspondants. Ces antigènes osidiques sont regroupés dans deux familles de structures bien distinctes : les glycoprotéines et les glycosphingolipides.

II.A. Les glycoprotéines

Les **mucines** sont des *O*-glycoprotéines très abondantes. Elles sont toutes constituées d'un premier maillon *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), associé par liaison alpha glycosidique à la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine, qui pourra être glycosylé en différentes positions pour former une organisation typique en grappe à la surface cellulaire. Dans les cellules saines où la biosynthèse osidique est réalisée par les glycosyltransférases, le pourcentage massique de ces glycoprotéines est

très élevé. Cependant, Springer^[2] identifie il y a une trentaine d'années, les mucines MUC1 et MUC4, qui surexpriment les antigènes saccharidiques Tn et TF (Thomsen-Friedenreich) dans la membrane de cellules cancéreuses (*Figure 2*).

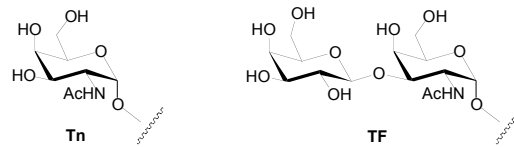


Figure 2 : Structure des antigènes osidiques Tn et TF

Ces structures osidiques particulières, plus courtes que leurs homologues naturelles, sont dues à une mauvaise régulation de la β -1,6-GlcNAc transférase. Il a été démontré récemment par le groupe de Cummings^[3] que l'expression de ces glycosyltransférases est régulée par une protéine chaperon, nommée Cosmc, qui réside dans le réticulum endoplasmique. Des mutations génétiques entraînent une perte de l'activité de Cosmc qui se traduit par l'inactivation des glycosyltransférases. En revanche, une augmentation de l'activité des sialyltransférases dans les cellules cancéreuses conduit à une surexpression de dérivés sialylés (*Figure 3*) comme les antigènes STn (sialyl-Tn) et STF (sialyl-TF).

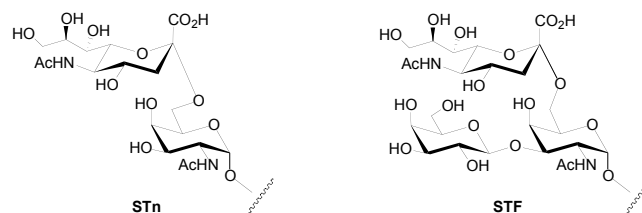


Figure 3 : Structure des antigènes osidiques STn et STF

Ainsi, MUC1 se présente avec une glycosylation réduite et désordonnée dans les tumeurs, contrairement aux mucines exprimées sur les cellules normales. Cette caractéristique est un premier facteur qui contribue à son immunogénicité. Le second aspect très important est l'hypoglycosylation qui démasque la partie peptidique normalement non visible. Le système immunitaire le considère alors comme une autre source d'antigène. Ces caractéristiques de MUC1 dans les tissus tumoraux en font une cible tout à fait appropriée pour le développement de vaccins antitumoraux.

II.B. Les glycosphingolipides

Certains antigènes osidiques sont liés à des sphingolipides comme un céramide, on parle alors de glycosphingolipides. Cette famille de glycolipides est elle-même divisée en trois sous-catégories. La

première, les *gangliosides* est constituée d'un motif commun lactosyl lié à un céramide et substitué par d'autres unités sucres dont au moins une est estérifiée par l'acide sialique comme dans le fucosyl GM1, GM2, GM3 ou encore GD3 et GD2 (*Figure 4*).

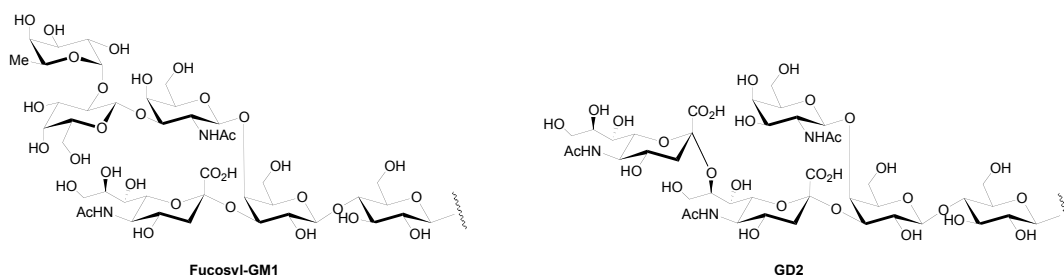


Figure 4 : Exemples de structures osidiques de la famille des gangliosides

La seconde famille, les antigènes « *Lewis* » sont des oligosaccharides sialylées ou non (Le^a , SLe^a , Le^b , SLe^x et Le^y) présentant comme structure minimale le *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) relié un résidu galactose (Gal) par un lien β 1-4 (*Figure 5*).

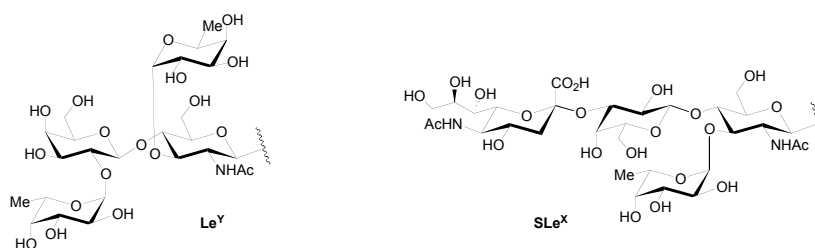


Figure 5 : Exemples de structures osidiques de la famille des antigènes Lewis

Enfin, les *globosides* comme Globo-H, Gb3, Gb4 et Gb5 représentent la troisième catégorie. Ces derniers sont le plus souvent une combinaison de résidus Gal, glucose (Glc) et GalNAc (*Figure 6*).

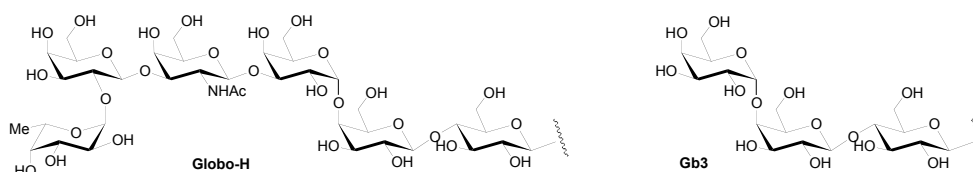


Figure 6 : Exemples de structures osidiques de la famille des globosides

Ces différents TACA sont fortement exprimés à la surface des cellules tumorales et cette surexpression permet de différencier les cellules cancéreuses des cellules saines. D'autre part, ces TACA sont retrouvés associés à plusieurs types de cancer (*Tableau 1*).^[4] Par exemple, les gangliosides GM2 et GD2 sont surexprimés dans de nombreux cas de mélanome, sarcome et neuroblastome. Les antigènes Globo-H et Le^y sont souvent exprimés dans une variété de cancer épithéliale comme les cancers du sein, de la prostate ou de l'ovaire.

Type de cancer	Marqueurs osidiques associés
Mélanome	GM2, GM3, GD2
Neuroblastome	GM2, GD2
Sarcome	GM2, GD2, GD3
Sein	GM2, Globo-H, Tn, TF, Le ^y
Prostate	GM2, Globo-H, Tn, TF, STn, Le ^y
Poumon	GM2, Globo-H, Le ^y
Ovaire	GM2, Globo-H, TF, STn, Le ^y

Tableau 1 : Principaux TACA associés à différents types de cancer

III. Comment induire une réponse immunitaire contre le cancer ?

La conception de candidats vaccins anti-tumoraux efficaces est particulièrement critique, principalement en raison de la complexité des mécanismes d'action immunitaires. Sans rentrer dans les détails immunologiques, nous allons décrire brièvement les principaux mécanismes et les cellules clé du système immunitaire.

1. Les cellules du système immunitaire

- *Lymphocytes*

Il en existe deux types : les lymphocytes B et les lymphocytes T, qui diffèrent par leurs fonctions et leurs récepteurs cellulaires. Les **lymphocytes B** sont responsables de l'immunité humorale : ils ont pour rôle principal de fabriquer des immunoglobulines (Ig) spécifiques d'un antigène du non-soi après activation et différenciation en plasmocytes. Les **lymphocytes T** sont responsables de l'immunité cellulaire : ils jouent un rôle dans la réponse immunitaire secondaire. Nous allons nous intéresser à deux groupes de lymphocytes T :

- Les *lymphocytes T CD4+* (T-helper) sont des intermédiaires de la réponse immunitaire, ils prolifèrent pour activer les lymphocytes B. Cela va permettre le transfert (« switch ») des anticorps de faible affinité (IgM) en anticorps de haute affinité (IgG) et la mise en place d'un effet mémoire.

- Les *lymphocytes T CD8+* qui se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les CTL sont capables de détruire les cellules cibles qui présentent l'antigène grâce à des agents cytotoxiques.

- *Les cellules présentatrices d'antigènes (APC)*

Elles regroupent les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B exprimant des protéines membranaires appelées *Complexe majeur d'histocompatibilité* (CMH). Leur rôle est de capturer des éléments étrangers (« non-soi ») présents dans l'organisme. Ces APC vont dégrader ces éléments pour pouvoir, par l'intermédiaire des CMH, activer les lymphocytes T et induire une réponse *T-cell dépendante*.

III.A. Réponse T-cell indépendante

Contrairement aux vaccins antibactériens basés sur des fragments de polysaccharides capsulaires très immunogènes, l'utilisation de TACA n'est pas suffisamment efficace pour induire une réponse immunitaire durable dirigée contre les cellules cancéreuses. Cela est dû à leur faible pouvoir immunogène et leur incapacité à activer les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$. Les TACA sont donc considérés comme *T-cell indépendant* car ils sont uniquement capables d'induire une réponse *B-cell*.

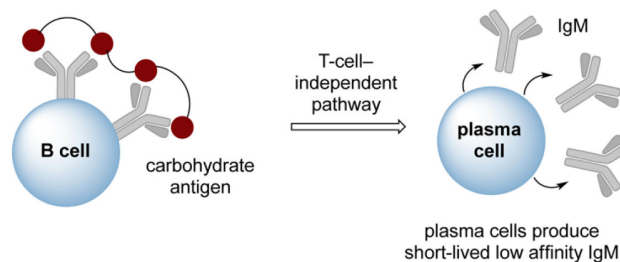


Figure 7 : Mécanisme immunitaire de la réponse B-cell

Dans ce cas, le cluster d'antigènes osidiques va dans un premier temps être reconnu et capturé par l'intermédiaire des anticorps membranaires (BCR) présents à la surface des lymphocytes B (*Figure 7*). Cela va provoquer l'activation des lymphocytes B et la production d'anticorps de faible affinité (IgM). En effet, les antigènes osidiques à eux seuls ne permettent pas aux lymphocytes B de recruter les lymphocytes T $CD4^+$ par l'intermédiaire des CMH, éléments indispensables pour obtenir une réponse *T-cell dépendante*. Par conséquent, stimuler ce type de réponse *T-cell indépendante* n'a que peu d'intérêt dans le cas des cancers. De plus, une difficulté supplémentaire de l'utilisation des TACA est qu'ils sont perçus comme des antigènes du soi, car ils sont issus de la transformation de cellules saines. Or, le système immunitaire possède des lymphocytes T régulateurs (*Treg*) qui permettent d'éviter une réponse dirigée contre des structures du soi. Ceci

renforce l'importance de la conception du vaccin pour contourner ces obstacles et stimuler une réponse efficace et durable contre les tumeurs.

III.B. Réponse T-cell dépendante

Pour résoudre ce problème, il est désormais admis qu'il faut associer les TACA avec des épitopes *T-cell dépendant* $CD4^+$ et $CD8^+$, afin de stimuler une réponse immunitaire spécifique dirigée contre la tumeur et assurer un effet mémoire.^[5] Ces épitopes vont permettre aux cellules présentatrices d'antigènes de stimuler les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ après internalisation de l'antigène. Il existe deux types de réponses *T-cell dépendante* :

- La réponse humorale qui consiste à induire des anticorps de haute affinité.
- La réponse cellulaire qui permet la production d'agents cytotoxiques.

- *Réponse humorale*

Dans le cas d'une réponse humorale, les TACA vont être reconnus par les BCR des lymphocytes B comme dans le cas précédent, puis le candidat vaccin (ou antigène) va être internalisé. Une fois cette étape clé franchie, il va subir des dégradations enzymatiques pour former des fragments peptidiques, les épitopes $CD4^+$, qui seront externalisés et présentés par l'intermédiaire du récepteur CMH de type II (*Figure 8*).

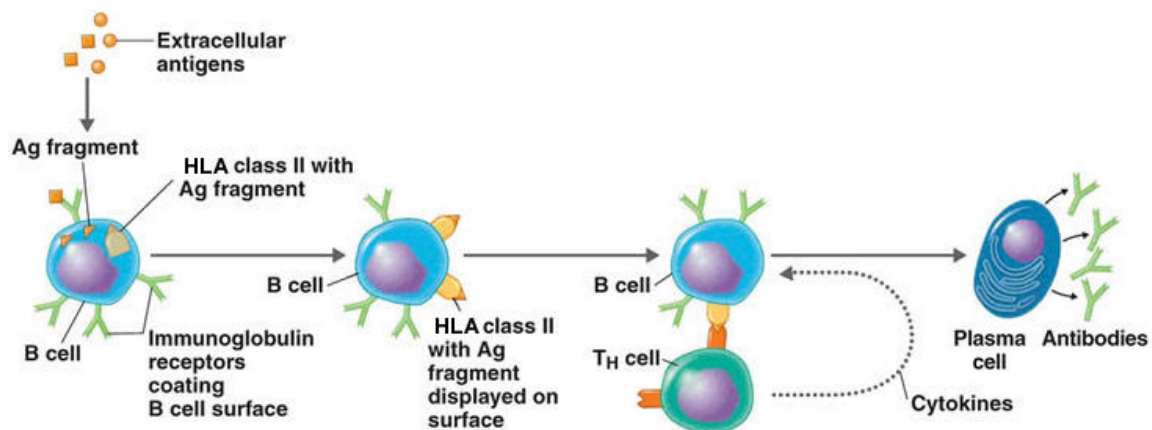


Figure 8 : Représentation de la réponse humorale

Un peptide présenté par les CMH de type II au récepteur $\alpha\beta$ -TCR des lymphocytes T $CD4^+$ va provoquer la production de cytokines et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. L'activation des lymphocytes B va induire le « switch » des IgM en IgG et ainsi permettre l'élimination des cellules tumorales par lyse médiée par le complément (CDC, *complement*

dependant cytotoxicity) ou en facilitant la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*).^[6] Nous ne décrivons pas ces mécanismes en détail ici.

- *Réponse cellulaire*

En revanche, la présence de TACA n'est pas nécessaire pour stimuler une réponse cellulaire. Dans ce cas, la délivrance du vaccin (ou de l'antigène) dans les APC peut être assurée par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs membranaires :

- les *Toll-like receptors* (TLR) exprimés à la surface des APC sont capables de reconnaître des structures particulières associées à des pathogènes comme des acides nucléiques ou des lipides. Chez l'homme, les TLR constituent une famille de dix protéines, dont le récepteur TLR2 qui peut lier l'acide palmitique ou le *S*-[(*R*)-2,3-dipalmitoyloxy-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-cysteine (Pam₃Cys) ou le TLR9 qui a pour ligand agoniste des oligonucléotides comme la séquence CpG. Une fois activés, les TLR peuvent notamment internaliser et dégrader les antigènes pour présenter des fragments aux lymphocytes T et produire des facteurs de signalisation comme les cytokines.

- les récepteurs à mannose, encore nommés DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ou CD209 (Cluster de Différentiation 209) sont présents à la surface des macrophages et des cellules dendritiques^{[7] [8] [9] [10]}. Ils reconnaissent des pathogènes exprimant des clusters de mannose pour induire leur endocytose et leur phagocytose.

Par conséquent, pour induire une réponse cellulaire par les CTL, il faut associer un des ligands de TLR ou DC-SIGN à une protéine exprimée par une cellule cancéreuse. Ceci permettra d'internaliser l'antigène dans l'APC où il sera dégradé par le protéasome pour produire des fragments peptidiques, les épitopes CD8⁺. Ces peptides seront alors présentés par l'intermédiaire des CMH de type I aux récepteurs $\gamma\delta$ -TCR des lymphocytes T CD8⁺. Cette interaction va provoquer l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CTL qui seront capables de détruire spécifiquement les cellules tumorales exprimant cet antigène grâce à la production d'agents cytotoxiques comme des perforines (*Figure 9*). Il faut également préciser que les cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺ permettent d'améliorer l'efficacité de la réponse cellulaire.

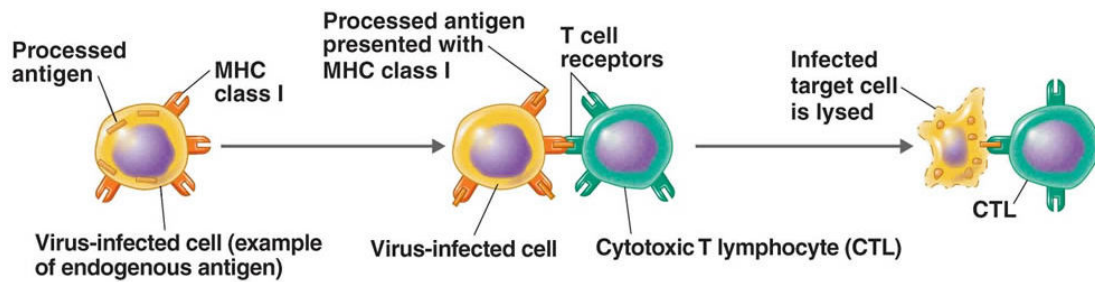


Figure 9 : Représentation de la réponse cellulaire

Dans la suite de cette partie bibliographique, nous nous intéresserons plus particulièrement aux vaccins antitumoraux à base de TACA.

IV. Comment concevoir un vaccin anti-tumoral ?

De manière générale pour concevoir un vaccin contre le cancer, les TACA sont souvent conjugués de manière covalente par l'intermédiaire d'un bras espaceur (**linker**), à une **structure porteuse**. Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'étape clé de la stimulation immunitaire est la reconnaissance du glycoconjugué par les BCR. La présentation de TACA en cluster permettra d'induire un « clustering » des BCR (voir *Chapitre II*), ce qui va fortement augmenter l'affinité du vaccin par des phénomènes de multivalence et ainsi assurer un meilleur ciblage des lymphocytes B. De plus, la nature, la longueur, les propriétés de rigidité/flexibilité du linker sont autant de paramètres à prendre en compte dans le design de candidat vaccin car ils peuvent influencer la reconnaissance et les propriétés immunologiques.^[11] Ces paramètres sont étroitement liés aux méthodes de couplages permettant d'introduire les TACA sur la structure porteuse.

Il existe deux grandes classes de vaccins anti-tumoraux : les vaccins semi-synthétiques et les synthétiques.^[12] La différence est liée à la nature de la structure porteuse qui peut, soit être extraite d'une source naturelle (protéine, capsid de virus, etc) on parle dans ce cas de vaccin semi-synthétique, soit être une plateforme préparée chimiquement (peptide linéaire, cyclodécapeptide, dendrimère, etc) on parle alors de vaccin synthétique (*Figure 10*).

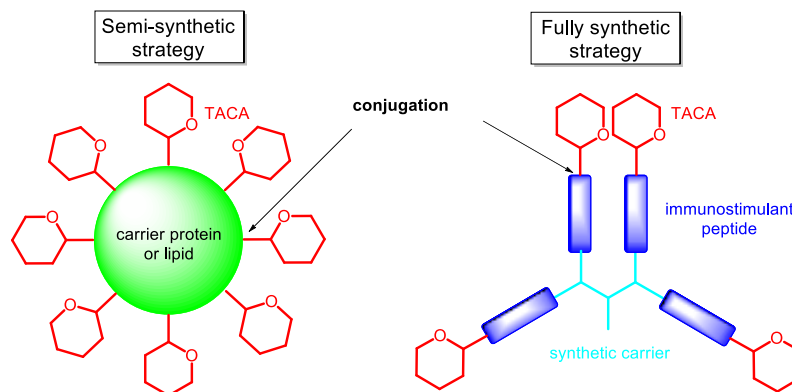


Figure 10 : Vaccin semi-synthétique et synthétique

Dans les sections suivantes nous présenterons une sélection des différents types de vaccins décrit à ce jour, capables de déclencher une réponse immunitaire efficace et ciblée. Dans un premier temps nous donnerons un aperçu des différents vaccins semi-synthétiques obtenus à partir du couplage covalent de TACA avec : *i)* une protéine porteuse ; *ii)* une partie lipidique pour former des liposomes ; *iii)* des polysaccharides zwitterioniques. Ensuite nous décrirons des structures de vaccins entièrement synthétiques à partir de châssis moléculaire, constitué soit *i)* de deux composants ; *ii)* de trois composants.

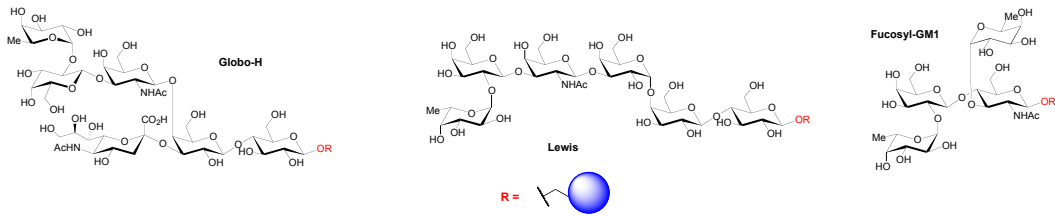
V. Approche semi-synthétique

1. Protéine porteuse

Les premiers glycoconjugués utilisés comme vaccin étaient constitués de fragments de polysaccharides capsulaires issus de bactérie avec une protéine porteuse de type KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), BSA (*bovine serum albumin*) ou TTox (*tetanus toxoid*). Ces protéines internalisées et découpées dans les APC, libèrent des séquences peptidiques particulières d'environ 15 acides aminés (épitopes $CD4^+$) capables de se lier au CMH de type II. Dans le cas d'une approche **semi-synthétique** (Figure 10), la structure porteuse a donc une double fonction : elle permet l'ancrage des marqueurs osidiques mais apporte également les épitopes *T-cell dépendant* requis.

Landsteiner^[13] démontre pour la première fois en 1942, que certaines protéines immunogènes sont capables de favoriser la production d'anticorps dirigés contre une variété d'antigène. Les TACA peuvent être conjugués sur ce type de protéine de trois manières différentes : *i)* sous forme de monomère *ii)* sous forme d'homocluster ou *iii)* d'hétérocluster (Figure 11).

Monomérique



Homocluster



Hétérocluster

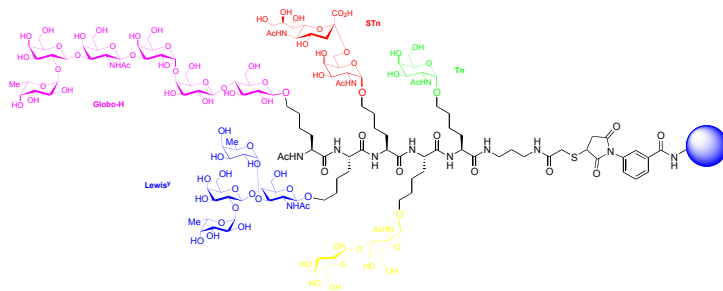


Figure 11 : Structure des différents vaccins semi-synthétiques proposés par le groupe de Danishefsky

- *Vaccins monomériques*

Les groupes de Danishefsky et Livingston ont été les premiers à développer des vaccins monomériques basés sur l'assemblage covalent de plusieurs copies d'un seul type de TACA, directement sur KLH. Généralement, le TACA est conjugué à la structure porteuse par amination réductrice ou par addition de Michael entre un thiol et un maléimide (Figure 12). Trois de ces vaccins monovalent Globo H-KLH 1, Lewis^Y-KLH 2 et GM₁-KLH 3 (Figure 12) font actuellement l'objet d'études cliniques avancées.

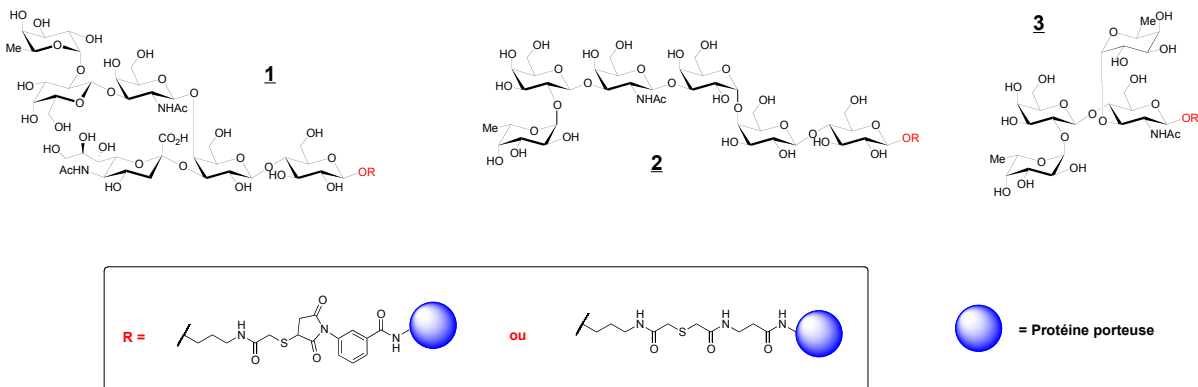


Figure 12 : Structure des vaccins monomériques 1, 2 et 3

Après avoir entrepris avec succès la synthèse de l'antigène Globo-H en utilisant la stratégie des glycals^[14], l'équipe de Danishefsky s'est intéressée aux propriétés immunologiques d'un premier conjugué, le Globo H-KLH 1 obtenu avec un taux de greffage d'environ 150 copies d'antigènes

osidiques par KLH. Des tests cliniques^[15] montrent que chez l'homme, sur les cinq patients atteints d'un cancer de la prostate immunisés, tous induisent une forte réaction immunitaire avec production d'IgM, en revanche seulement deux sur les cinq produisent des IgG. Des études de cytométrie de flux ont été réalisées pour déterminer les propriétés de reconnaissance de ces anticorps vis-à-vis des cellules MCF-7, une lignée de cellules tumorales mammaires très utilisée car elle exprime les mêmes TACA. Les résultats indiquent que les anticorps produits par chacun des cinq patients immunisés sont capables de reconnaître ces cellules. D'autres essais cliniques toujours réalisés chez des patients atteints de cancer de la prostate,^[16] montrent que l'immunisation par le vaccin Globo H-KLH **1** en présence d'un adjuvant externe de la famille des saponines (QS-21) est sans danger et ne présente pas de toxicité particulière chez l'humain. Chez deux patients sur cinq, des effets thérapeutiques caractérisés par une diminution de la concentration des antigènes spécifiques de la prostate (PSA, *Prostate-Specific Antigen*) ont même été observés. Des résultats similaires ont été obtenus chez des patientes souffrant de cancer du sein. Les auteurs démontrent également que ce type de vaccin est capable de déclencher des mécanismes de CDC et ADCC conduisant à la destruction tumorale.

L'équipe de Danishefsky décrit en 1995 la synthèse du vaccin constitué du pentasaccharide Lewis^Y conjugué à KLH **2** (*Figure 12*),^[17] les auteurs estiment qu'il est possible d'attacher en moyenne 540 résidus de Le^Y par protéine porteuse. Les tests d'immunisations réalisés chez la souris,^[18] montrent qu'en présence de l'adjuvant QS-21, une quantité élevée d'IgM et d'IgG a été obtenue et que ces anticorps sont capables de reconnaître l'antigène osidique Le^Y. Des essais cliniques sur 25 patientes atteintes d'un cancer des ovaires ont ensuite été réalisés^[19] et montrent ici encore que le vaccin est bien toléré par l'ensemble des patientes et qu'aucun effet secondaire n'est observé. Contrairement aux résultats observés chez la souris, seulement 16 patientes sur 24 produisent des IgM et uniquement trois des IgG. En revanche une très forte concentration d'anticorps dirigés contre la protéine porteuse KLH est observée, suggérant que la réponse immunitaire est dominée par KLH et non par la tumeur ciblée.

Avec des structures analogues portant l'antigène Fuc-GM1, des tests précliniques ont été réalisés chez la souris^[20] *i)* avec un dérivé de Fuc-GM1 seul, *ii)* le Fuc-GM1 co-injecté avec KLH ou *iii)* le Fuc-GM1 lié de manière covalente à KLH (Fuc GM1-KLH **3** *Figure 12*). Les trois candidats vaccins sont co-administrés avec l'adjuvant QS-21. Le dérivé de Fuc-GM1 lié à KLH (Fuc-GM1-KLH **3**) semble être le vaccin le plus efficace, car il induit une forte concentration d'anticorps dirigés contre Fuc-GM1 (déterminé par ELISA). De plus, les patients immunisés avec le dérivé Fuc-GM1 génèrent des anticorps de type IgG et IgM.^[21]

- *Vaccins de type homocluster*

Comme les TACA sont surexprimés sous forme de cluster à la surface des cellules cancéreuses, une autre stratégie inspirée des travaux réalisés par Carlstedt et Davies,^[22] consiste à renforcer la réponse immunitaire induite en augmentant la concentration locale en antigène. Pour cela, les TACA ne sont pas conjugués directement à la protéine porteuse comme précédemment mais par l'intermédiaire d'un peptide ce qui permet leur présentation sous forme de cluster. Sur ce principe, l'équipe de Danishefsky^[23] a préparé une seconde génération de vaccin, plus élaborée, où un tripeptide portant les antigènes Tn(c) **4**, TF(c) **5** ou STn(c) **6** est conjugué à KLH par réaction entre thiol et maléimide (*Figure 13*).

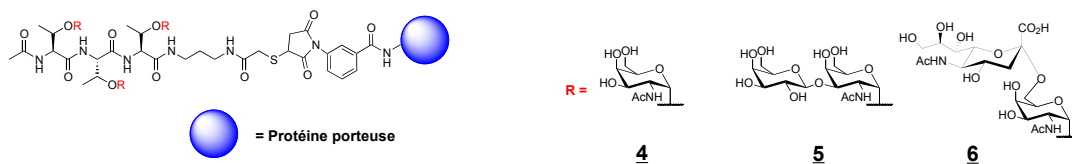


Figure 13 : Structure des homoclusters Tn, TF et STn

Ces composés ont ensuite été soumis à des tests immunologiques puis les résultats ont été comparés avec ceux obtenus pour les vaccins monomériques présentés précédemment. Un effet de multivalence a été mis en évidence^[24] avec l'homocluster Tn(c)-KLH **4**. Il a en effet été démontré que plus le nombre de cluster de Tn est conjugué à la protéine porteuse (ratio de 648 :1 *versus* 201 :1), plus la réponse immunitaire induite, c'est-à-dire le taux d'anticorps produits est important. Par conséquent, le ratio épitope saccharidique/KLH semble être déterminant pour induire une réponse immunitaire efficace. Ensuite les mêmes auteurs ont comparé la quantité d'anticorps produits par la molécule Tn-KLH ou son homologue Tn(c)-KLH **4** portant le cluster de Tn (*Figure 13*). Les résultats déterminés par ELISA et cytométrie de flux confirment cet effet, puisque dans chaque expérience la quantité d'anticorps est nettement plus importante dans le cas du Tn(c)-KLH **4**. Les tests cliniques réalisés chez l'homme avec ce même composé montrent que le vaccin est bien toléré par les patients et qu'il induit une forte réponse humorale comme cela a été observé chez la souris.^[25] Des résultats similaires ont été observés avec le vaccin TF(c)-KLH **5**, portant l'antigène TF à la place de Tn (*Figure 13*).^[26] En revanche, contrairement aux antigènes Tn et TF, aucune différence notable n'est observée dans le cas de l'antigène STn.^[27] En effet, les souris immunisées avec le vaccin, soit sous forme monomérique (STn-KLH), soit sous forme de cluster (STn(c)-KLH **6**) (*Figure 13*) montrent quasiment la même quantité d'anticorps (IgM et IgG) dans les deux cas. De plus, ces anticorps sont capables de reconnaître spécifiquement la protéine OSM (comme source naturel d'antigène STn). Aucune hypothèse n'a été avancée par les auteurs pour expliquer cette

différence de comportement entre ces différentes constructions. Ces études montrent toutefois clairement l'utilité de présenter des TACA en cluster, même si dans certains cas le bénéfice sur la réponse immunitaire induite n'est pas significatif.

- *Vaccins de type hétérocluster*

Les vaccins monomériques de première génération et les clusters de deuxième génération ne reflètent pas la micro-hétérogénéité des cellules cancéreuses. En effet, comme nous avons discuté précédemment, plusieurs types de TACA sont associés à un seul type de cancer (*Tableau 1*), de plus

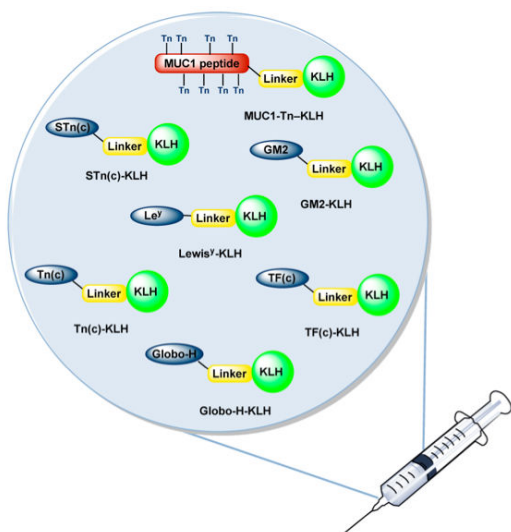


Figure 14 : Vaccination par un mélange de composé monomérique

le taux de glycosylation évolue au cours de la maladie. Or, si une tumeur échappe au système immunitaire au moment de la vaccination, elle va continuer à évoluer avec la maladie et le vaccin ne sera plus efficace contre les nouveaux antigènes exprimés. Un vaccin constitué de plusieurs TACA permettrait d'assurer une protection à différents stades de la maladie. Pour cela, le même groupe propose d'abord d'utiliser simultanément un mélange de différents monomères de TACA conjugués à KLH, le GM2, Globo-H, Le^y, Tn(c), TF(c), STn(c) et la glycoprotéine MUC-1^[28] pour déclencher une réponse immunitaire dirigée contre chacun de ces sept antigènes

(*Figure 14*). Les tests précliniques réalisés montrent que les souris immunisées avec ce mélange de vaccin génèrent des anticorps dirigés contre chaque antigène à l'exception de GM2. De plus, les anticorps produits sont généralement de type IgM et IgG, sauf pour l'antigène Lewis qui induit seulement des IgM. Les tests cliniques ont été réalisés en 2007 chez neuf patients en rémission de différents types de cancer.^[29] Huit patients sur neuf ont produit des anticorps dirigés contre au moins trois antigènes, malheureusement la quantité d'anticorps est nettement inférieure au niveau atteint avec les antigènes conjugués correspondant pris individuellement. Ces résultats ont été attribués à l'utilisation de KLH, qui engendre une réponse dirigée contre la protéine porteuse en quantité bien supérieure aux exemples précédents. Ainsi, une baisse significative de la réponse immunitaire dirigée contre les antigènes osidiques est observée.

Pour faire face à ce problème, une troisième génération de vaccin a été développée par l'équipe de Danishefsky et Livingston. L'objectif de cette nouvelle approche consiste à conjuguer un cluster de différents TACA (hétérocluster) sur la même protéine porteuse (*Figure 15*).

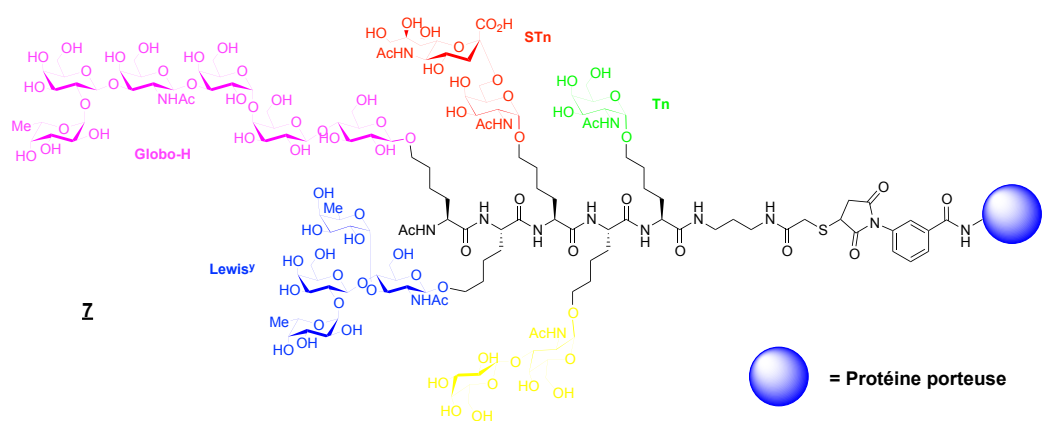


Figure 15 : Structure de l'hétérocluster pentavalent Tn, TF, STn, Globo-H et Le^Y

La présentation des antigènes sous formes d'hétérocluster à la surface de KLH comporte de nombreux avantages : *i*) la quantité de KLH est réduite par rapport au vaccin précédent ; *ii*) la structure obtenue mime plus efficacement l'hétérogénéité présente à la surface des cellules cancéreuses ; *iii*) des effets synergiques peuvent être favorisés entre les différents antigènes présentés. Pour valider cette approche,^[30] la synthèse d'un hétérocluster trivalent contenant les antigènes Globo-H, Tn et Lewis^y conjugué à KLH a été réalisée.^[31] Les résultats immunologiques obtenus sont très positifs puisque les souris immunisées avec le vaccin trivalent **8** (Figure 16), induisent une forte réaction immunitaire dirigée contre les trois antigènes. De plus les anticorps produits ont une très forte affinité avec les cellules MCF-7.

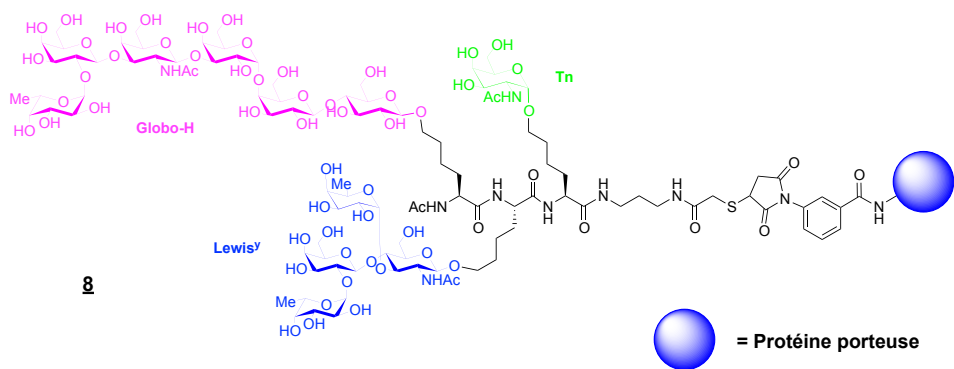


Figure 16 : Structure de l'hétérocluster trivalent Tn, Globo-H et Le^Y

Le même groupe^[32] décrit plus récemment la synthèse de vaccin pentavalent constitué des antigènes osidiques Globo-H, Tn, STn, TF et Lewis^Y **7** (Figure 15), avec un ratio glycopeptide/KLH élevé (228:1). Les études préliminaires conduites chez la souris ont montré une forte production d'anticorps dirigés contre tous les antigènes à l'exception de l'antigène Le^Y (ELISA). Une étude complémentaire réalisée par cytométrie de flux montre que les anticorps produits ont une très forte affinité pour les cellules exprimant ces cinq différents antigènes.

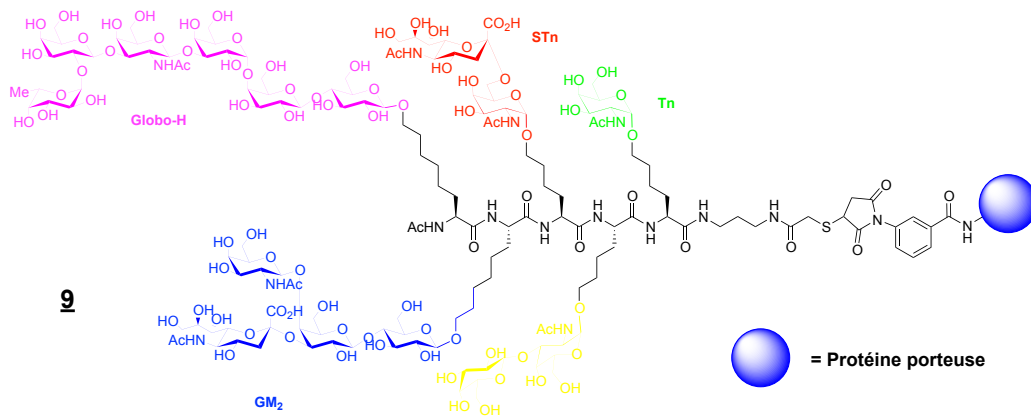


Figure 17 : Structure de l'hétérocluster pentavalent Tn, TF, STn, Globo-H et GM2

Pour finir, les mêmes auteurs^[33] décident de remplacer le dérivé osidique Le^Y par GM2 9 (Figure 17). En effet, la faible immunogénicité de Le^Y pourrait être la cause de l'absence de réponse observée contre cet antigène dans l'expérience précédente. Les études précliniques ont montré que ce nouveau vaccin pentavalent conjugué à KLH 9 est bien toléré et induit bien une bonne réponse immunitaire dirigée contre chacun des cinq antigènes.^[34]

V.A. Vaccins comportant la séquence répétitive MUC-1

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les glycoprotéines de la famille de mucine (MUC1 et MUC4 principalement) sont des cibles très attractives pour le développement de vaccins anticancéreux et de nombreuses structures à base de mucines ont été décrites à ce jour. Ces glycoprotéines sont surexprimées sur les cellules tumorales épithéliales, notamment dans le cas de cancer du sein. En effet, le domaine extracellulaire des cellules cancéreuses contient la séquence peptidique HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA possédant cinq sites potentiels de glycosylation : Thr₄, Ser₅, Thr₉, Ser₁₅ et Thr₁₆ (en rouge Figure 18).

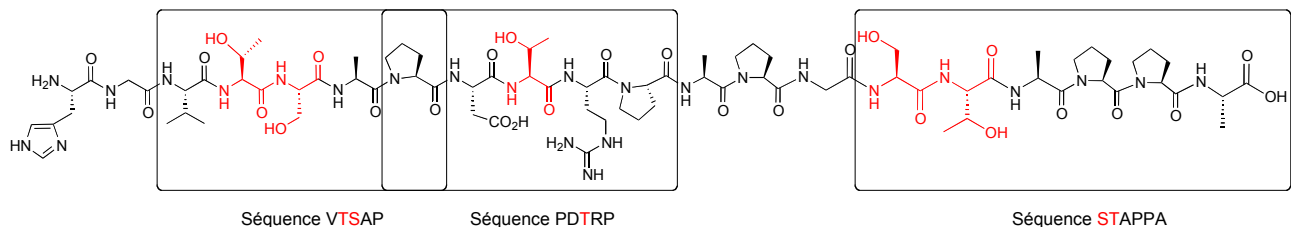


Figure 18 : Représentation des séquences peptidiques répétitives de MUC1

Ces cinq sites glycosylation sont regroupés au sein de trois séquences répétitives : VTSAP, PDTRP et STAPPA. La glycosylation d'une séquence plutôt qu'une autre peut entraîner des conséquences plus ou moins prononcées sur la structure de l'antigène et par conséquent sur la réponse immunitaire. Alors que ces séquences peptidiques sont masquées par les imposants complexes

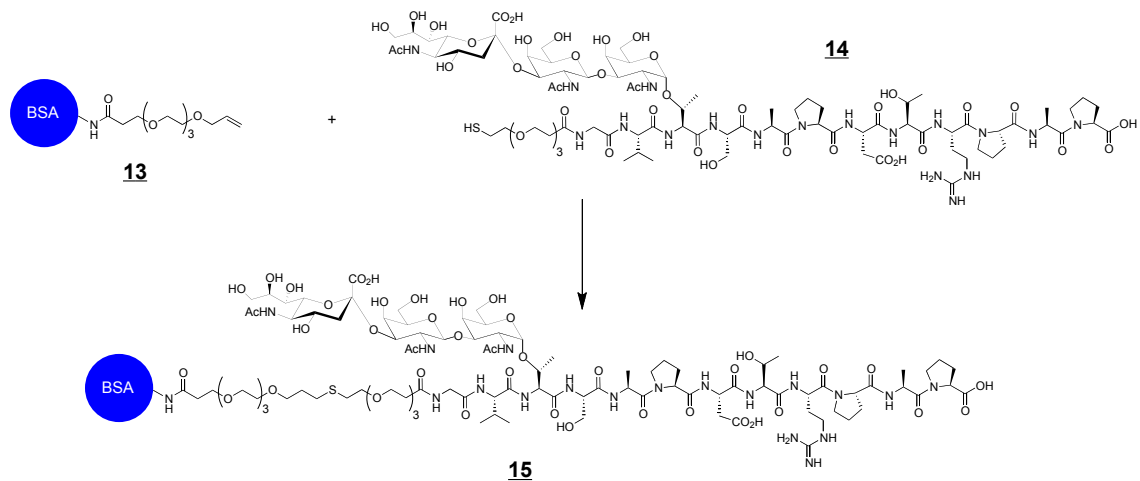


Schéma 2 : Conjugaison du glycopeptide **14** sur la protéine porteuse BSA par ligation thiol-ène

Après dialyse et lyophilisation, une analyse par MALDI-TOF indique que le vaccin STF₄-MUC1-BSA **15** contient en moyenne huit glycopeptides **14** par molécule de BSA. De plus, les acides aminés sensibles (tryptophane, tyrosine) présents dans la séquence répétitive de MUC1 n'ont pas été affectés par la réaction de couplage photochimique. L'avantage de cette approche est que le lien thioéther est immunologiquement inerte. Cependant, cette approche est rarement utilisée, probablement en raison des difficultés liées à sa mise en place.

La conjugaison d'un glycoconjugué contenant l'antigène osidique STn (en position Thr₄ VTSAP) et la séquence peptidique raccourcie de MUC1 GVT**S**APDTRP à KLH a été proposée selon une autre méthode^[37] (Schéma 3).

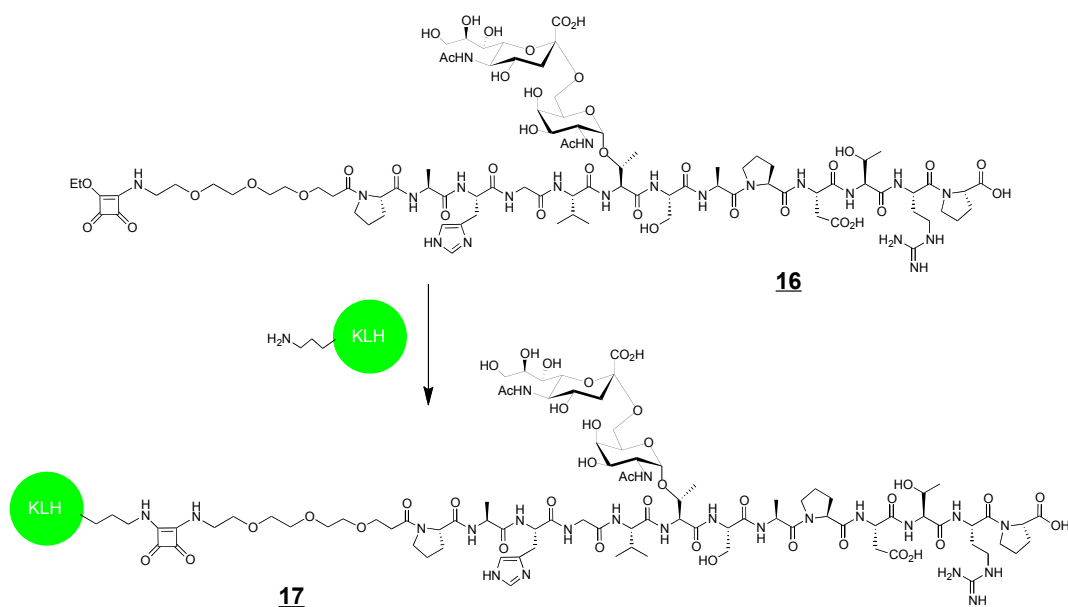


Schéma 3 : Conjugaison du glycopeptide **16** sur la protéine porteuse BSA par l'intermédiaire du squarate **12**

Le couplage sur les amines libres présentes sur la protéine porteuse est réalisé à partir du glycopeptide STn₄-MUC1 **16** portant un monoester squarique. Jusqu'à six copies du glycopeptide activé **16** sont d'abord couplées, puis le vaccin STn₄-MUC1-KLH **17** est isolé par centrifugation. Ce composé a été caractérisé par RMN et spectroscopie de masse. Les mêmes auteurs^[38] ont plus récemment décrit des vaccins contenant la protéine porteuse TTox, car elle semble plus adaptée pour immuniser des humains (bien qu'étant beaucoup plus chère). Pour cela, le glycopeptide STn₄-MUC1 contenant une séquence de MUC1 plus longue (HGV**TS**APD**TR**PAPG**ST**AP) et portant l'antigène osidique STn sur la même position (Thr₄ séquence répétitive **VTS**AP) a été préparé. Ensuite, ce glycopeptide est couplé à TTox afin de donner le vaccin STn₄-MUC1-TTox **18** (Figure 19) selon la procédure précédente.

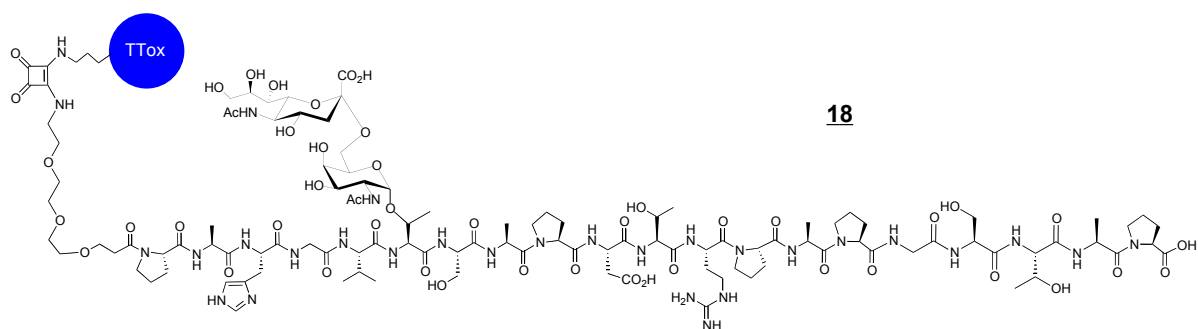


Figure 19 : Structure du composé STn₄-MUC1-TTox **18**

Les tests d'immunisation ont montré des résultats très encourageants puisque toutes les souris immunisées avec le vaccin STn₄-MUC1-TTox **18** induisent une forte réponse immunitaire. Des études complémentaires ont permis de mettre en évidence que les anticorps produits sont très spécifiques du glycopeptide STn₄-MUC1. En revanche, aucune réponse n'a été observée dans le cas du peptide MUC1 non glycosylé ou constitué d'une séquence peptidique différente comme MUC4 par exemple. De plus, les anticorps produits sont hautement spécifiques des cellules tumorales. Toutefois, un inconvénient majeur de cette stratégie (qui sera discuté plus loin dans ce chapitre) est qu'il est très difficile de déterminer précisément le nombre de glycopeptide STn₄-MUC1 que l'on peut introduire sur TTox, et donc que le couplage est reproductible. En effet, les auteurs supposent qu'une moyenne de 20 molécules de glycopeptide est conjugué sur TTox, cependant cette hypothèse ne peut pas être confirmée par spectroscopie de masse en raison du point moléculaire trop élevé du composé STn₄-MUC1-TTox **18**. Pour cette raison, les auteurs utiliseront plutôt la protéine porteuse BSA, qui conduit à des composés plus faciles à caractériser.

Le groupe de Kunz propose ensuite d'introduire l'antigène osidique sur une position différente pour étudier l'influence de cette modification sur la réponse immunitaire induite. En effet, des études

préalables suggèrent que la glycosylation d'un résidu osidique sur la séquence répétitive **STAPPA** de MUC1 change radicalement la conformation du glycopeptide.^{[39] [40]} Ainsi, les vaccins **STn₁₅-MUC1-BSA 19** et **STn₁₆-MUC1-BSA 20** glycosylés par un STn en positions Ser₁₅ ou Thr₁₆ ont été synthétisés suivant le protocole décrit pour **17** puis des tests d'immunisation ont été réalisés (*Figure 20*).^[41]

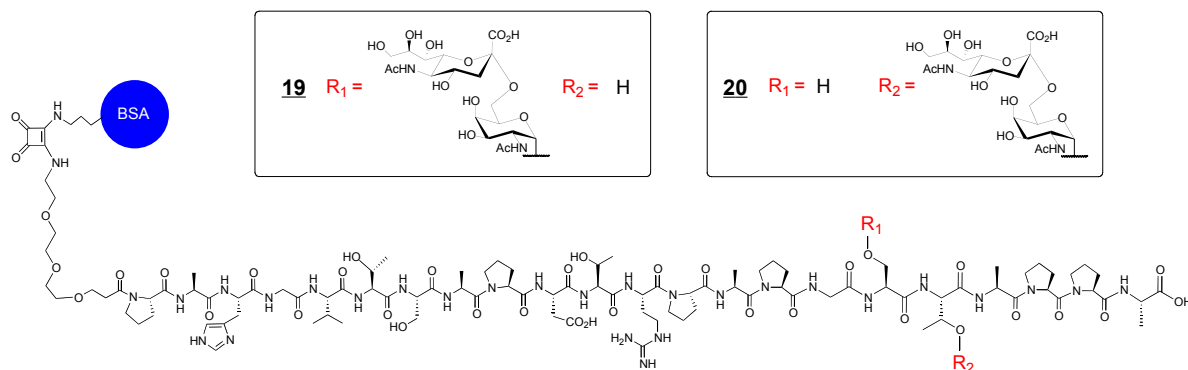


Figure 20 : Structure des composés **STn₁₅-MUC1-BSA 19** et **STn₁₆-MUC1-BSA 20**

Toutes les souris immunisées avec les vaccins **19** et **20** induisent une forte réaction immunitaire avec production d'IgM et d'IgG, très spécifique des cellules MCF-7. De plus, des études de cytométrie de flux démontrent que les anticorps produits par des souris immunisées par **19** reconnaissent parfaitement les cellules T-47D humaines du cancer du sein. Cette interaction est inhibée en présence du glycopeptide portant le même antigène, ce qui témoigne de la sélectivité des anticorps pour **19**. Cette étude montre que la présence d'un sucre sur une position donnée va fortement modifier la conformation du glycopeptide MUC1 et les anticorps produits semblent particulièrement spécifiques de chaque type de structure.

La même année, Kunz et ses collaborateurs^[42] ont préparé le composé **Tn₉-STn₁₅-MUC1-BSA 21**, ne portant pas un mais plusieurs antigènes osidiques différents sur la même séquence peptidique (*Figure 21*).

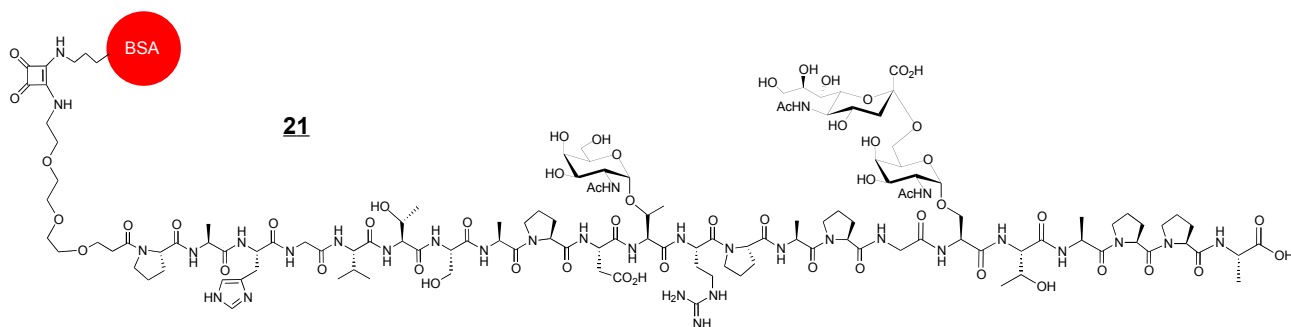


Figure 21 : Structure du composé **Tn₉-STn₁₅-MUC1-BSA 21**

Ce fragment de MUC1 qui contient l'antigène Tn sur la séquence répétitive PDTRP en position Thr₉ et l'antigène STn sur la séquence répétitive STAPPA en position Ser₁₅ a été conjugué à la protéine porteuse BSA. Les souris immunisées avec ce vaccin montrent qu'une forte réponse immunitaire est induite, contenant à la fois des IgM et des IgG,^[43] de plus ces anticorps témoignent d'une forte affinité pour les cellules MCF-7. Cette étude montre qu'une glycosylation sur le résidu Thr₉ semble renforcer la réponse immunitaire, car la quantité d'anticorps est nettement supérieure que dans le cas où le vaccin est glycosylé en position Ser₁₅ ou Thr₁₆ uniquement.

V.B. Utilisation de TACA artificiels

Une approche intéressante pour contourner le faible pouvoir immunogène des TACA consiste à les utiliser sous différentes formes. Par exemple, les gangliosides comme l'antigène GD3 possédant au moins une fonction acide carboxylique (acide sialique) et de nombreuses fonctions hydroxyles, vont être en mesure de former des lactones à pH acides (*Schéma 4*). La présence de lactone influence de manière plus ou moins prononcée la structure générale du ganglioside, ce qui peut avoir un effet sur les propriétés immunologiques.^[44]

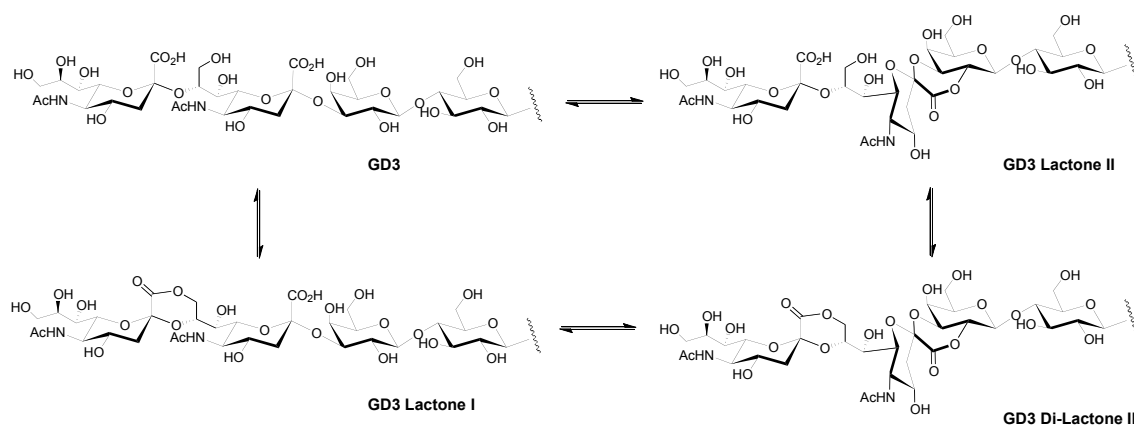


Schéma 4 : Représentation des différentes structures de GD3 à pH acide

En se basant sur les travaux de Nores de 1987,^[45] Livingston et ses collaborateurs^[46] ont préparé trois dérivés de l'antigène GD3 : GD3-lactone, GD3-amide et GD3 gangliosidole. Les tests d'immunisation ont montré que chacun de ces trois dérivés sont immunogènes chez la souris, cependant seul GD3-lactone produit des anticorps capables de reconnaître spécifiquement l'antigène GD3 naturel. Dans une étude plus récente,^[47] le même groupe démontre que le dérivé GD3-lactone conjugué à une protéine porteuse de type KLH en présence de QS-21, induit la production d'IgG et d'IgM ayant la faculté de se lier à GD3 avec une grande affinité. En revanche, la conjugaison de l'antigène GD3 à KLH ne produit aucun anticorps (ni IgG ni IgM). Ces résultats

semblent indiquer que la tolérance vis-à-vis de GD3 peut être levée en remplaçant ce dernier par son dérivé GD3-lactone.

Une autre alternative pour augmenter le pouvoir immunogène des TACA consiste à utiliser des dérivés synthétiques non naturels pour mimer ces structures. Ce type de dérivés présente également l'avantage d'être plus stable vis-à-vis des dégradations enzymatiques. Par exemple, le ganglioside GM3 **22** est un motif fortement exprimé à la surface des tumeurs du mélanome, en particulier sur les cellules ayant un potentiel métastatique élevé. Son métabolite, la GM3-lactone **23** (Figure 22), bien qu'exprimé faiblement sur les cellules du mélanome, est plus immunogène que GM3 et est donc considéré comme le réel antigène associé à ce cancer. Cependant, bien qu'il soit plus immunogène que son précurseur, le dérivé GM3-lactone **23** ne peut être utilisé en immunothérapie en raison de son instabilité dans les conditions physiologiques. Ainsi, de nombreux efforts ont été menés pour préparer des substances analogues à GM3-lactone **23**, qui soient stables *in vivo* et qu'on puisse utiliser comme constituant de vaccin. Le groupe de Nativi a récemment préparé le composé **24** (Figure 22), qui s'est avéré stable dans les conditions physiologiques et plus simple d'un point de vue structural que l'antigène naturel.^[48] Ce composé **24** conserve la conformation caractéristique de la GM3-lactone qui est responsable de sa meilleure immunogénicité comparé au ganglioside GM3 comme nous venons de le voir.

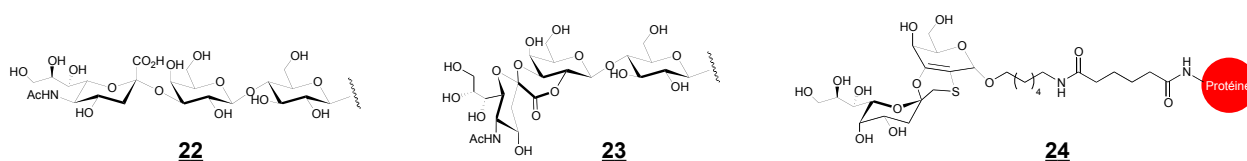


Figure 22 : Structure des antigènes GM3 **22**, GM3-lactone **23** et du mime **24** proposés par le groupe de Nativi

Une fois conjugué à KLH, le vaccin obtenu est utilisé pour des tests d'immunisation *in vivo*. Il a été montré que ce glycoconjugué est capable d'induire la formation d'anticorps spécifiques qui reconnaissent les antigènes osidiques exprimés par le mélanome.^[49] Ce mime d'antigène a également été utilisé plus récemment pour d'autres études immunologiques.^{[50] [51]} Ce même groupe a également proposé des mimes des antigènes Tn et TF comme nous le verrons au cours du Chapitre I.^[52]

Comme nous l'avons signalé précédemment, les antigènes osidiques portant un ou plusieurs acides sialiques sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, principalement en raison de la mauvaise régulation des sialyltransférases. Ainsi l'acide sialique est un marqueur tumoral de choix pour la conception de vaccins. Cependant, le lien covalent permettant d'attacher l'acide sialique au

glycoconjugué est l'un des liens glycosidiques les plus labiles. En effet, il est facilement clivable *in vitro* dans des conditions acides douces et *in vivo* par dégradation enzymatique par des neuraminidases. Des travaux réalisés par Kishi et ses collaborateurs^[53] ont démontré que les *O-glycosides* (Figure 23A) et les *C-glycosides* (Figure 23B) ont des caractéristiques conformationnelles identiques, cependant ces derniers ont une stabilité accrue. Partant de ce constat, l'équipe de Linhardt^[54] propose en 2003 de substituer l'atome d'oxygène du STn (en rouge Figure 23A) par un atome de carbone (Figure 23B) et ainsi former des analogues de TACA.

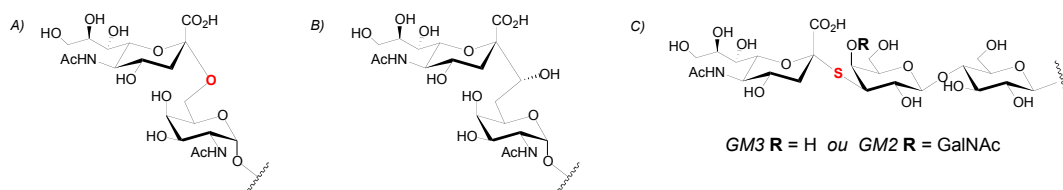


Figure 23 : Structure d'analogues des antigènes STn (B) et GM3 (C)

En 2005, le groupe de Bundle^[55] propose de remplacer l'atome d'oxygène du lien glycosidique non plus par un atome de carbone mais par un soufre. Le choix de l'atome de soufre est dicté par trois raisons : *i*) la synthèse de dérivé sulfuré est simple ; *ii*) leur conformation est proche des TACA naturels (*O-glycosides*) ; *iii*) enfin ils sont plus stables vis-à-vis de la dégradation enzymatique et de l'hydrolyse acide. Les auteurs ont ainsi préparé deux dérivés d'antigènes osidiques (GM2 et GM3 représentés Figure 23C) qui ont par la suite été conjugués à une protéine porteuse comme TTox. Les tests immunologiques réalisés ensuite sur ces TACA modifiés tendent à démontrer qu'ils induisent la production d'une quantité d'anticorps comparable au vaccin composé de TACA non modifié. En revanche, l'inconvénient majeur est que les anticorps produits dans ce cas sont nettement moins spécifiques car ils n'ont pas la même affinité pour les cellules cancéreuses exprimant le motif osidique.

En 2010, Kunz et ses collaborateurs^[56] proposent d'utiliser un analogue de l'antigène TF ou les hydroxyles en position 6 et 6' sont substitués par des atomes de fluor (Figure 24).

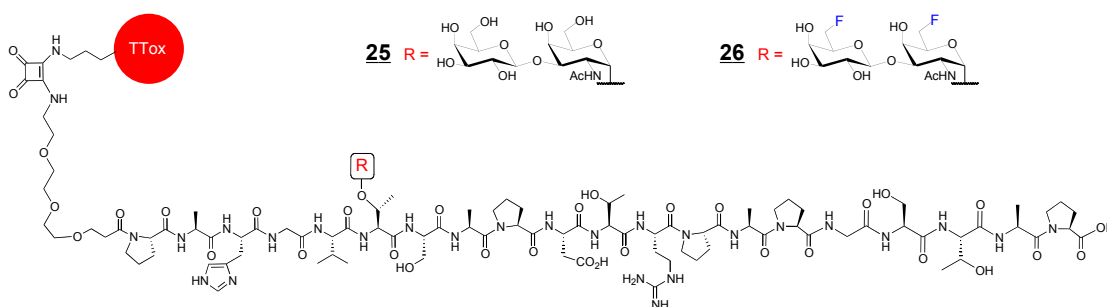


Figure 24 : Structure des composés TF-MUC1-TTox 25 et F₂-TF-MUC1-TTox 26

L'avantage de ce genre de TACA modifié (**26** *Figure 24*) est ici encore sa stabilité vis-à-vis de la dégradation enzymatique, ce qui rend leur utilisation intéressante notamment pour les patients suivant un traitement à long terme. L'analogue de MUC1 est conjugué à la protéine TTox puis testé sur des souris afin de déterminer la spécificité et la quantité d'anticorps produit par ELISA. Les résultats montrent que le composé TF-MUC1-TTox **25** et son analogue modifié F₂-TF-MUC1-TTox **26** produisent une forte réponse immunitaire avec production d'IgG. L'affinité des anticorps produits est évaluée par cytométrie de flux avec les cellules MCF-7. Les résultats obtenus montrent que le composé F₂-TF-MUC1-TTox **26** (tout comme son homologue TF-MUC1-TTox **25**) est capable d'induire des anticorps possédant une très forte affinité pour les cellules cancéreuses. L'ensemble des résultats suggèrent qu'un ou plusieurs groupements hydroxyles peuvent être substitués par des atomes de fluor sans pour autant diminuer l'immunogénicité du vaccin correspondant mais en augmentant sa stabilité *in vivo*.

V.C. Virus-Like Particles (VLP)

Une autre stratégie pour rompre l'immunotolérance associée au TACA est de présenter ces derniers de manière hautement organisée. Des études ont montré que ce type de présentation permet d'améliorer la reconnaissance de l'antigène osidique par les lymphocytes B, ce qui influence fortement la réponse immune induite. Pour cela, contrairement à une protéine porteuse comme KLH, la capsid des virus (*Virus-Like particles* VLP) composée de diverses protéines structurales auto-assemblées de manière très organisée peut être utilisée comme structure porteuse. Par exemple, les groupes de Huang et Finn^[57] proposent en 2007 d'utiliser la capsid du virus de la mosaïque du niébé PMV (*Cowpea mosaic Virus*) pour l'ancrage de divers TACA comme les antigènes Globo-H ou Lewis^X. Ce type de structures porteuses, sans danger pour l'homme, sont très fortement immunogènes pour un certains nombres de paramètres : *i*) leur taille qui permet de faciliter leur absorption par les APC ; *ii*) leur habilité à présenter une forte densité de TACA de manière hautement organisée et répétitive, ce qui améliore leur présentation au système immunitaire ; *iii*) leur capacité à induire une réponse *T-cell dépendante* avec production d'anticorps de haute affinité. Par comparaison, la réponse immunitaire induite dans ce cas est similaire à celle obtenue pour des vaccins constitués des mêmes antigènes osidiques conjugués à KLH.

En 2008, le même groupe^[58] fonctionnalise les résidus cystéines de la capsid du CPMV **27** par le dérivé de l'antigène Tn **28** portant une fonction maléimide (*Schéma 5*). Les auteurs supposent que

toutes les cystéines sont fonctionnalisées et que le composé Tn-CPMV **29** contient environ 60 copies du Tn **28**.

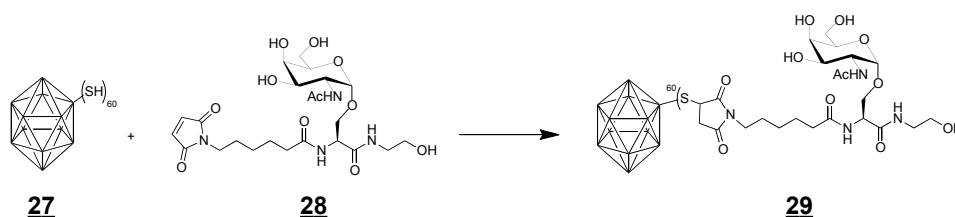


Schéma 5 : Conjugaison du dérivé **28** sur la capsidite du CPMV

Les souris immunisées avec le vaccin **29** en présence d'adjuvant, induise une forte quantité d'IgM et d'IgG dirigés contre l'antigène Tn. Ces anticorps ont également une très forte affinité pour les cellules MCF-7 et NCI-ADR RES (cellule cancéreuse de l'ovaire). En 2012,^[59] les mêmes auteurs ont remplacé la structure porteuse précédente par la capsidite du virus de la mosaïque du tabac TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), afin d'étudier ses propriétés immunologiques. La cycloaddition de Huisgen permet d'introduire l'antigène osidique Tn à différentes positions sur la capsidite, puis une étude sur l'influence de ce paramètre sur la réponse immunitaire induite a été réalisée. Il a été montré que l'introduction d'environ 1500 copies d'antigènes Tn sur l'extrémité *N*-terminal de la protéine TMV semble non immunogène (*Schéma 6A*). En revanche, la présence de 2000 copies de TACA sur la tyrosine 139 induit une forte réaction immunitaire avec production d'IgM et d'IgG (*Schéma 6B*).

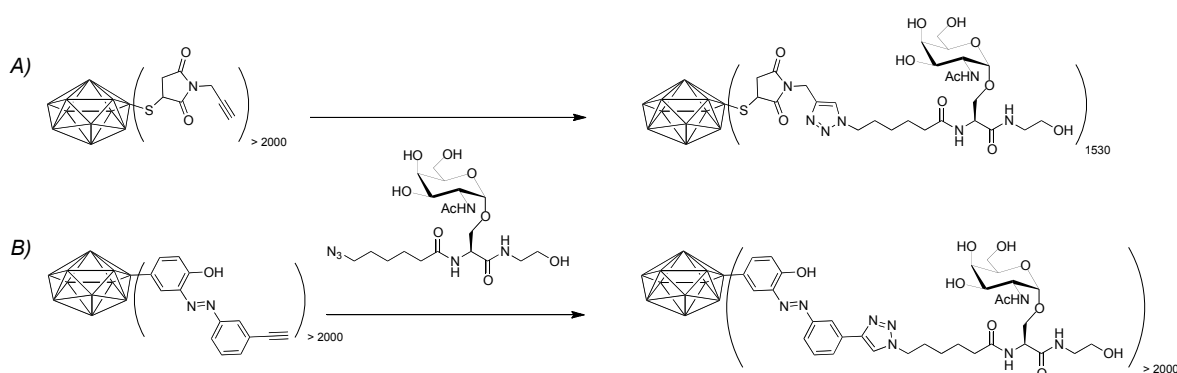


Schéma 6 : Conjugaison du dérivé de l'antigène Tn sur la capsidite du TMV *A*) en *N*-terminal et *B*) sur Tyr 139

Très récemment, les mêmes groupes^[60] ont également utilisé la capsidite du bactériophage Q β comme point d'ancrage pour 340 copies de l'antigène Tn. Ce type de structure, très dense en TACA, permet de mimer fidèlement la structure native des mucines. Les résultats des tests précliniques montrent que la quantité d'IgG produite par les souris immunisées avec le candidat vaccin Tn-Q β est plus élevée que dans le cas des composés Tn-CPMV et Tn-TMV décrits précédemment. Des plus, les anticorps produits sont très sélectifs vis à vis de l'antigène Tn, ce qui

confirme l'intérêt de mimer la densité de TACA exprimée par les tumeurs. Bien que pour le moment aucun vaccin obtenu suivant cette stratégie n'ait fait l'objet d'étude clinique, les VLP représentent une alternative crédible aux traditionnelles protéines porteuses moins bien tolérées comme KLH, pour le développement d'une immunothérapie anticancéreuse.

V.D. Liposome

Comme nous l'avons vu précédemment, la structure porteuse semi-synthétique est généralement une protéine (KLH, BSA, TTox...). Une autre approche consiste à utiliser une molécule capable de s'auto-assembler en solution pour former des liposomes qui présentent les avantages d'induire une faible immunogénicité intrinsèque et d'être moins sensible à la protéolyse *in vivo*. La formation de liposome requiert la conjugaison des TACA à un lipopeptide ou un lipide tel que le Pam₃Cys issu de la séquence *N*-terminal d'*Escherichia Coli*, ou l'acide palmitique connus pour leurs propriétés de vectorisation par les TLR comme nous l'avons vu précédemment. La partie lipidique pourrait d'autre part procurer des propriétés auto-adjuvantes au vaccin. En effet, les adjuvants sont des molécules comme le QS-21, les sels d'aluminium (Alum) ou adjuvant de Freund's (CFA) qui sont co-administrés avec le vaccin afin de « booster » la réponse immune spécifique induite par l'antigène, bien que n'ayant pas de vertu antigénique en soi. Or, leur utilisation est toujours sujette à controverse en raison de problèmes liés à leur toxicité. L'utilisation de ligands agonistes des TLR présente donc une alternative intéressante car ils sont capables d'induire la production de cytokine, la maturation des APC et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en CTL.

Le groupe de Boons^[61] est l'un des pionniers dans ce domaine. Il décrit en 2005 la synthèse d'un vaccin particulier constitué de trois composants : l'antigène tumoral Tn (épitope *B-cell*), le peptide YAF stimulant les lymphocytes T de séquence YAFKYARHANVGRNAFELFLG (épitope *T-cell dépendant*) et le Pam₃Cys (*Figure 25a*).

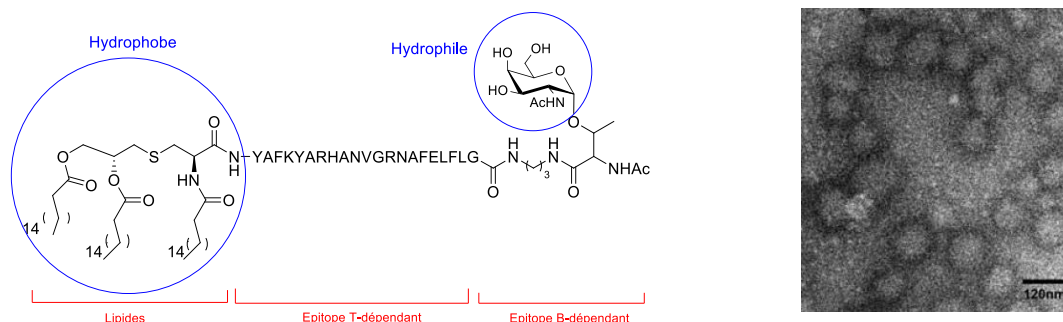


Figure 25 : a) Structure du vaccin synthétique décrit par le groupe de Boons contenant une tête hydrophile et une queue hydrophobe b) Liposomes observés au microscope électronique.

Ce type de vaccin a la particularité de posséder une tête hydrophile par la présence de l'antigène osidique et une queue hydrophobe avec les trois acides gras de Pam₃Cys. Ces propriétés vont favoriser l'auto-organisation du vaccin en liposome et vont aussi faciliter l'incorporation de l'antigène dans la cellule. Boons et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence la formation de liposomes d'environ 100 nm par TEM (microscope électronique à transmission) (*Figure 25b*). Les souris immunisées avec ce vaccin en présence de QS-21 (malgré le liposome) induisent une quantité d'anticorps IgM et IgG dirigés contre l'antigène osidique plutôt modeste. Les auteurs expliquent que la faible réponse immunitaire observée peut être attribuée au choix du peptide immunostimulant YAF. En effet, cette séquence particulière a été identifiée comme activateur des MHC de type II chez l'homme, cependant ces propriétés semblent plus limitées chez la souris. En 2007, le même groupe propose de faire évoluer la structure de leur vaccin à trois composants^[62] afin d'améliorer la réponse immunitaire. Ainsi, le peptide YAF est remplacé par un dérivé du poliovirus PV qui a la particularité d'être mieux adapté au modèle murin. L'épitope *B-cell* est également modifié car l'antigène Tn n'est plus sous forme monomérique mais présenté sous forme de cluster à la surface de la séquence répétitive PDTRP de MUC1. Enfin, la partie lipidique a également été modifiée puisque deux dérivés de Pam₃Cys sont introduits sur le vaccin : le Pam₂CysSK₄ et le Pam₃CysSK₄ pour déterminer l'influence sur la réponse immunitaire induite. Les souris immunisées avec le composé Pam₃CysSK₄-PV-MUC1(Tn) **31** induisent une quantité importante d'IgM et d'IgG, en revanche les résultats sont plus modérés dans le cas du vaccin Pam₂CysSK₄-PV-MUC1(Tn) **30** (*Figure 26*).

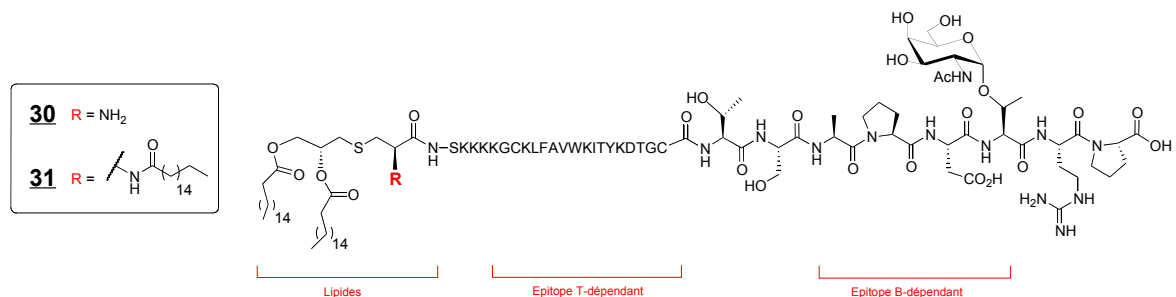


Figure 26 : Structure des composés Pam₂CysSK₄-PV-MUC1(Tn) **30 et Pam₃CysSK₄-PV-MUC1(Tn) **31****

Des études complémentaires ont montré que la co-administration des vaccins **30** et **31** en présence de QS-21 améliore la réponse immunitaire induite, de plus les anticorps produits ont une forte affinité pour les cellules MCF-7. Les auteurs ont ensuite cherché à déterminer l'influence de la présentation sous forme de liposome et celle type de liaison entre les trois constituants du vaccin. Dans un premier temps, il a été démontré que la conjugaison du ligand Pam₃CysSK₄ aux épitopes *B-cell* et *T-cell* augmente la concentration locale en cytokine qui permet de mieux cibler la réponse immune induite contre les cellules tumorales. De plus, alors qu'en règle générale, le vaccin doit d'abord être reconnu par des récepteurs des APC afin d'initier la réponse immunitaire, il a été

proposé que la formation de liposome permet de s'affranchir de ce processus puisque le motif Pam₃Cys est masqué dans le liposome et donc pourrait être moins disponible pour jouer son rôle de ligand de TLR.^[5]

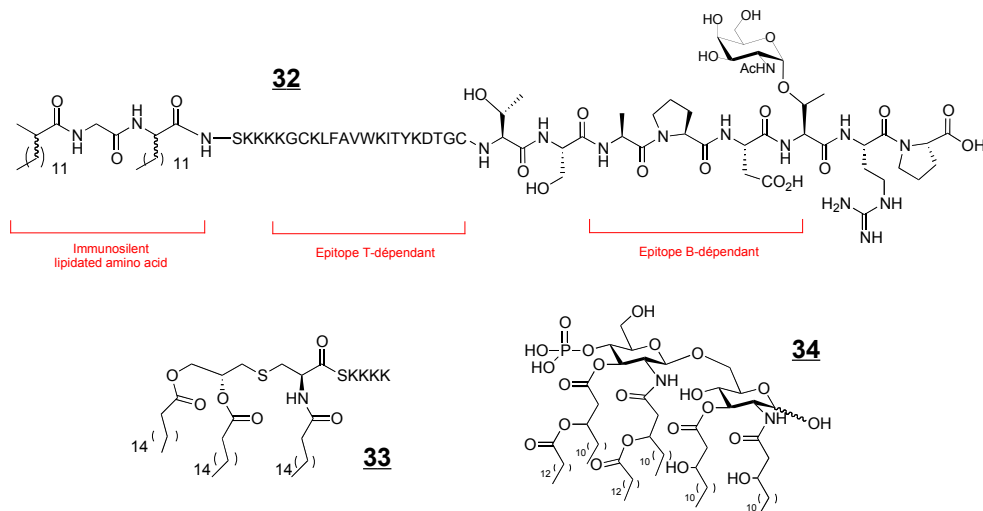


Figure 27 : Structure du composé immuno-silencieux **32** co-administré avec Pam₃Cys **33** ou le monophosphoryl lipid A **34**

Dans une autre étude,^[63] l'importance de la partie lipidique comme ligand pour les TLR est évaluée. Ainsi, le composé **32** dont le lipide Pam₃Cys est remplacé par un lipopeptide immuno-silencieux a été préparé (Figure 27). Une faible quantité d'IgG a été obtenue chez les souris immunisées avec ce composé. En revanche, lorsque **32** est co-administré soit avec Pam₃Cys **33** soit le monophosphoryl lipid A **34** la quantité d'IgG produite est similaire à celle obtenue pour le vaccin précédent (**31** Figure 26 page précédente). Cependant, les anticorps induit dans ce cas n'ont pas la même habilité à reconnaître les cellules cancéreuses. Cette étude indique que la vectorisation par les TLR est un mécanisme complexe qui dépend fortement de la composition et de la formulation du vaccin.

V.E. Rhamnose

Le groupe de Sucheck^[64] décrit en 2009 une approche innovante, basée sur l'utilisation des anticorps naturels pour améliorer la reconnaissance du vaccin par le système immunitaire.^[65] Chaque individu possédant en effet une forte proportion d'anticorps dirigés contre le résidu rhamnose, les auteurs ont proposé

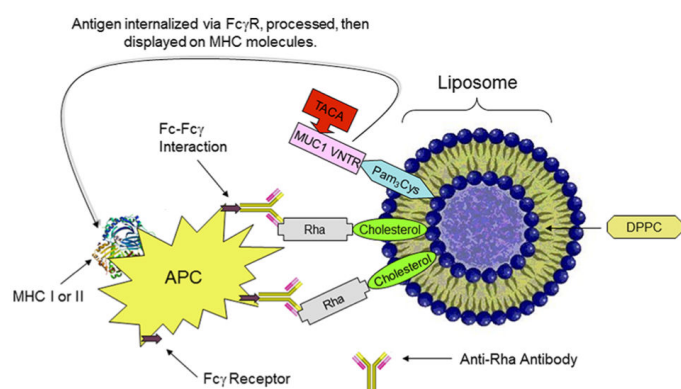


Figure 28 : Approche utilisée par le groupe de Sucheck

d'exploiter ce dérivé pour faciliter la reconnaissance et l'internalisation par les APC d'un vaccin composé de TACA et d'épitopes T-cell (Figure 28). Pour cela, le vaccin à trois composantes Rha-

YAF-Tn **35** a été synthétisé. Il est constitué de l'antigène Tn, du peptide YAF et d'un résidu rhamnose (*Figure 29*). Contrairement à l'homme, la souris ne possède pas d'anticorps anti-rhamnose. Ainsi, pour mimer le plus fidèlement possible le système biologique humain, les souris ont été au préalable immunisées avec le conjugué Rha-OVA afin de produire des anticorps anti-Rha, puis ces mêmes souris sont immunisées avec le vaccin trifonctionnel Rha-YAF-Tn **35**.

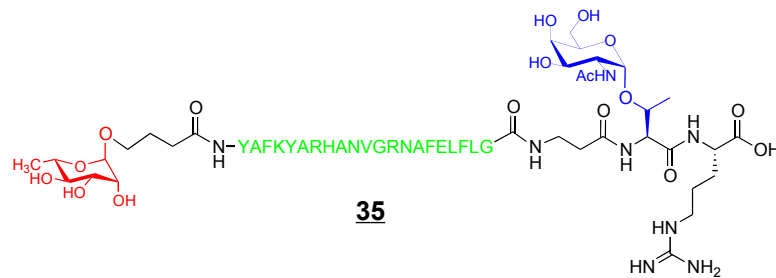


Figure 29 : Structure du composé Rha-YAF-Tn **35**

Les résultats montrent que les souris pré-immunisées avec Rha-OVA produisent une forte proportion d'IgG dirigés contre l'antigène Tn par rapport aux souris n'ayant pas subi de pré-immunisation. Il semblerait donc que les anticorps anti-Rha soient capables de reconnaître le composé Rha-YAF-Tn **35**, ce qui renforce le ciblage de ce dernier vers les APC et améliore la réponse immunitaire induite. Sur la base de ces premiers travaux, le même groupe^[66] propose de combiner les effets bénéfiques de la présentation du vaccin sous forme de liposome évoqué précédemment, avec les facultés du rhamnose à stimuler le système immunitaire (*Figure 28*). Dans un premier temps le vaccin Pam₃Cys-MUC1(Tn) **36** est assemblé par cycloaddition de Huisgen entre la séquence peptidique répétitive MUC1 portant l'antigène Tn et le Pam₃Cys (*Schéma 7*).

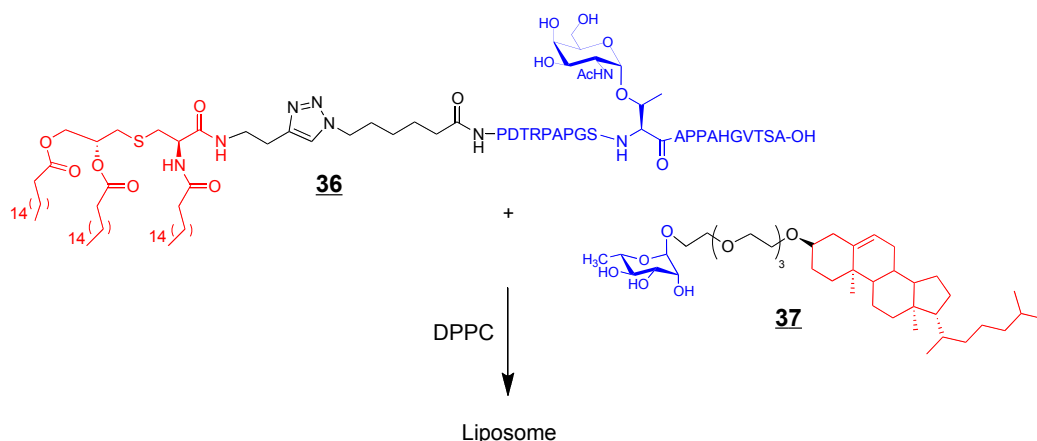


Schéma 7 : Auto-assemblage des composés **36** et **37** sous forme de liposome

Le composé Rha-cholestérol **37** constitué d'un résidu de rhamnose conjugué à une molécule de cholestérol est ensuite synthétisé. Pour finir, le liposome est formé par extrusion entre le vaccin

Pam₃Cys-MUC1(Tn) **36**, le résidu Rha-cholestérol **37** et du DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine). Le liposome obtenu est ensuite injecté chez des souris pré-immunisées. Il a été observé que la quantité d'anticorps obtenue est huit fois plus importante pour les souris pré-immunisées puis vaccinées avec le liposome, que dans le cas des souris non pré-immunisées mais vaccinées. Encore plus intéressant, les anticorps produits sont dirigés contre le glycopeptide MUC1 mais également contre l'antigène osidique Tn sans la partie peptidique. Ceci montre que cette approche basée sur l'utilisation de rhamnose pour améliorer le processus de ciblage des APC, est tout à fait pertinente pour stimuler efficacement une réponse immunitaire antitumorale.

V.F. Polysaccharides zwitterioniques (ZPS)

Bien que la majorité des antigènes osidiques soit *T-cell indépendant*, certains polysaccharides bien particuliers appelés *Zwitterionique* sont capables de déclencher une réponse immunitaire *T-cell dépendante* en absence de peptide immunostimulant ou d'une partie lipidique.^[67] Ces polysaccharides Zwitterionique (ZPS : *Zwitterionic Polysaccharide*) sont constitués d'une alternance de motifs osidiques chargés (positivement ou négativement), ce qui va permettre leur interaction avec les CMH de type II. De nombreuses bactéries possèdent des polysaccharides zwitterioniques au sein de leurs capsules, il s'agit notamment des souches PSA1 et PSA2 issues de *Bacteroides fragilis* ou bien encore de la souche SP1 issue de *Streptococcus pneumoniae* qui ont pour la plupart été identifiées comme des ligands potentiels des récepteurs TLR.^[68] Le groupe de Andreana^[69] a étudié la possibilité d'utiliser PSA1 comme plateforme de présentation d'antigène (Schéma 8).

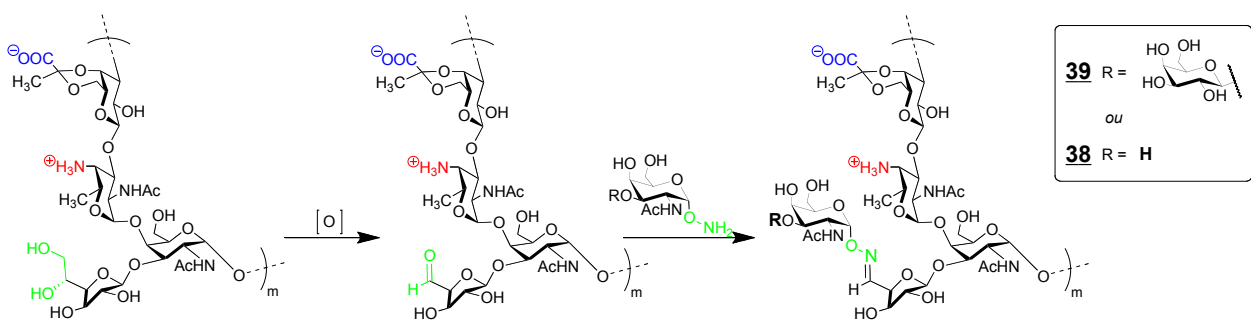


Schéma 8 : Utilisation d'un polysaccharide zwitterionique comme plateforme de présentation de l'antigène Tn

Pour cela, le glycoconjugé **38**, portant l'antigène Tn a été préparé par ligation oxime (voir *Chapitre 1*). Les souris immunisées avec ce composé **38** en présence ou en absence d'adjuvant induisent une forte réaction immunitaire dans les deux cas, ce qui témoigne des propriétés auto-adjuvants de ce type de construction. Les anticorps IgG obtenus montrent une forte affinité pour les

cellules tumorales exprimant l'antigène Tn.^[70] Pour finir très récemment,^[71] le même groupe a décrit la synthèse du composé **39** où l'antigène Tn est remplacé par le disaccharide TF. A notre connaissance, les résultats des tests d'immunisation non pas encore été publiés. Ces exemples illustrent l'intérêt d'utiliser des ZPS comme structure porteuse pour le développement de vaccins anticancéreux.

V.G. Inconvénients de l'approche semi-synthétique

La conjugaison d'un antigène osidique sur une structure porteuse représente certainement l'approche la plus utilisée pour préparer des vaccins anticancéreux. Cependant elle comporte quelques désavantages. L'utilisation de protéine porteuse (TTox, BSA, KLH) est souvent problématique. Bien que ces structures soient très immunogènes, elles induisent dans la plupart des cas une forte proportion d'anticorps dirigés contre la protéine porteuse elle-même et non contre les antigènes osidiques. Ceci s'explique par la faible proportion et densité de sucre greffé par rapport à la taille de la protéine. De plus, l'utilisation de ces constructions présente un inconvénient majeur lié à la chimie de couplage qui est difficile à contrôler et peu reproductible, ce qui conduit à des vaccins de compositions incertaines et à des taux de fonctionnalisation variables. De plus, la caractérisation des glycoconjugués semi-synthétiques par la spectroscopie de masse ou la RMN est très compliquée, en raison de la taille et de l'hétérogénéité de ces composés. Par conséquent, la composition ambiguë des molécules semi-synthétiques les rend peu adaptées à des applications vaccinales, pour des raisons évidentes de manque de reproductibilité de la réponse immune induite.

VI. Approche synthétique

Une alternative à ces problèmes consiste à assembler les marqueurs osidiques tumoraux et les peptides immunostimulants (épitope *T-cell*) de manière contrôlée suivant une organisation linéaire ou en utilisant une plate-forme moléculaire branchée généralement non immunogène (hormis pour quelques rares exceptions).^[72] La synthèse est généralement modulaire, les différents composants sont préparés indépendamment puis assemblés en suivant une approche convergente. Cela a pour conséquence de faciliter l'analyse du glycoconjugué par les méthodes classiques (MS, IR et RMN) et permet de déterminer la composition exacte du vaccin (par exemple le nombre de TACA par molécule). De plus, ces constructions offrent l'avantage de présenter une composition en sucre élevée par rapport à la taille de la molécule, favorisant une réponse B dépendante et une production d'anticorps spécifiques des tumeurs.

1. Vaccins synthétiques à deux composants

- *Utilisation d'une plate-forme dendrimérique*

En 1988, Tam^[73] décrit la synthèse d'une plateforme dendrimérique destinée à l'ancrage d'antigène peptidique. Ces dendrimères nommés MAP (*Multiple Antigen Peptide*) sont des structures branchées obtenues par élongation successive d'unités polyfonctionnelles autour d'un élément central exposant en bout de chaîne un nombre variable de fonctions amines. Ces molécules possèdent une structure globulaire présentant à leurs surfaces des antigènes à valence contrôlée, où chaque branchement constitue une nouvelle génération. Sur la base de ces travaux, l'équipe de Leclerc^[74] propose un vaccin, de faible poids moléculaire, de structure parfaitement définie et composé de plusieurs épitopes. Il s'agit du premier exemple de vaccin entièrement synthétique. Les auteurs ont démontré que le couplage covalent d'épitopes osidiques *B-dépendant* (antigène Tn) et de fragment peptidique du virus de la polio (épitope *T-cell dépendant* CD4⁺), sur une molécule dendrimérique (nommée *Multiple Antigenic Glycopeptide*, MAG), permet de stimuler le système immunitaire contre les TACA correspondants (*Figure 30*).

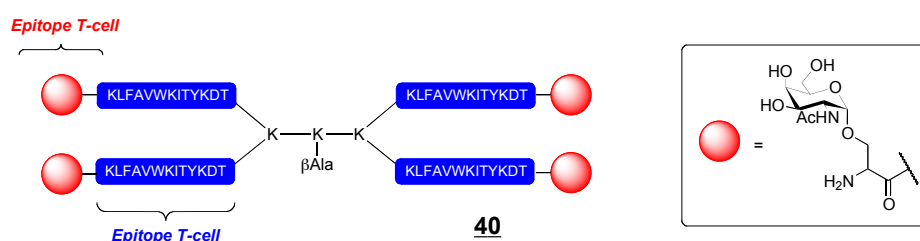


Figure 30 : Première exemple de vaccin synthétique contenant une plateforme dendrimérique décrit par le groupe de Leclerc

Le vaccin MAG:Tn-PV **40** induit en effet la production d'anticorps IgG anti-Tn capables de reconnaître spécifiquement les cellules cancéreuses.^[75] Sur la base de ces résultats prometteurs, le même groupe propose d'introduire un trimère de Tn à la place du monomère précédent pour étudier l'influence de la présentation des TACA en grappe sur la réponse *B-cell*.^[76] Comme attendu, les résultats des tests immunologiques montrent que le composé MAG:Tn3-PV **41** (*Figure 31*) produit une quantité d'anticorps (IgM et IgG compris) supérieure au MAG:Tn-PV **40** et qui sont capables de se lier avec une meilleure affinité aux cellules exprimant l'antigène Tn.

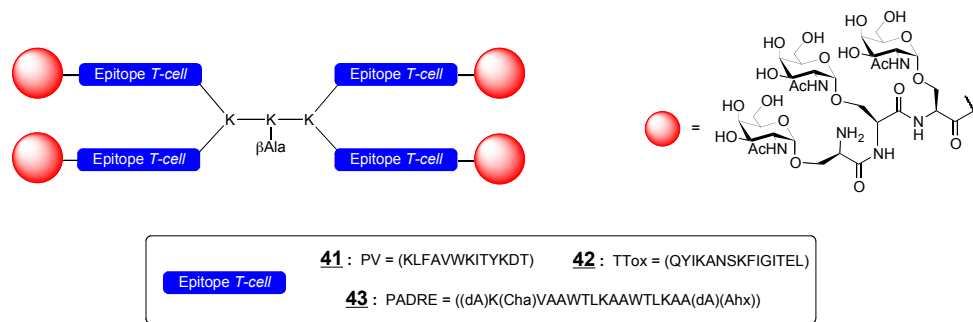


Figure 31 : Structure du vaccin MAG:Tn3-PV **41** contenant un trimère d'antigène Tn à chaque extrémité du dendrimère

De plus, une augmentation du taux de survie des souris immunisées par le vaccin **41** a été mise en évidence. L'influence de la séquence peptidique apportant les épitopes *T-cell* a ensuite été étudiée.^[77] Pour cela, trois peptides immunostimulants ont été choisis : PV (KLFAVWKITYKDT), TTox (QYIKANSKFIGITEL) et PADRE ((dA)K(Cha)VAAWTLKAAWTLKAA(dA)(Ahx)). Le dernier peptide est un épitope universel CMH II humain et murin car il permet d'éviter les problèmes de polymorphisme du système HLA (Human Leukocyte Antigen).^[78] D'abord les composés MAG:Tn3-PV **41**, MAG:Tn3-TTox **42** et MAG:Tn3-PADRE **43** (Figure 31) ont été synthétisés puis utilisés pour vacciner des primates. Chacun des trois candidats vaccins produit une quantité d'IgG quasiment similaire et dirigée contre l'antigène Tn et ces anticorps sont capables de déclencher une réponse ADCC contre les cellules tumorales. De plus, la réponse immunitaire induite par le vaccin MAG:Tn3-PV **41** est plus efficace que dans le cas du glycoconjugué KLH-Tn(c). Enfin, les études précliniques ont montré que ce type de vaccin synthétique est sans danger pour les primates car aucun effet secondaire (inflammation locale ou rejet du vaccin) n'est observé. Ces travaux témoignent de l'avantage indéniable de la stratégie MAG sur les traditionnels KLH glycoconjugués.

En 2010 les mécanismes immunologiques ont été étudiés plus en détail.^[79] Il a notamment été montré que la lectine nommée *Macrophage Galactose-type Lectin* (MGL) exprimée à la surface des cellules dendritiques est responsable de la capture du vaccin. De plus, les résultats suggèrent que le vaccin glycosylé MAG:Tn3-PV **41** est présenté aux lymphocytes T CD4⁺ de manière plus efficace que son homologue non glycosylé MAG-PV. Cette étude montre pour la première fois que la reconnaissance de l'antigène Tn par les MGL permet de délivrer le vaccin au système immunitaire et d'induire une réponse *T-cell* renforcée.

Sur la base de ces travaux, le groupe de Kunz^[80] a proposé de conjuguer sur la plate-forme dendrimérique **44** le glycopeptide **45** portant l'antigène Tn sur la position Thr₁₆ et le peptide

immunostimulant **P2** (TTo_x₈₃₀₋₈₄₃ : QYIKANSKFIGITE) sur l'extrémité *N*-terminale du mime de MUC1 par cycloaddition de Huisgen (*Schéma 9*).

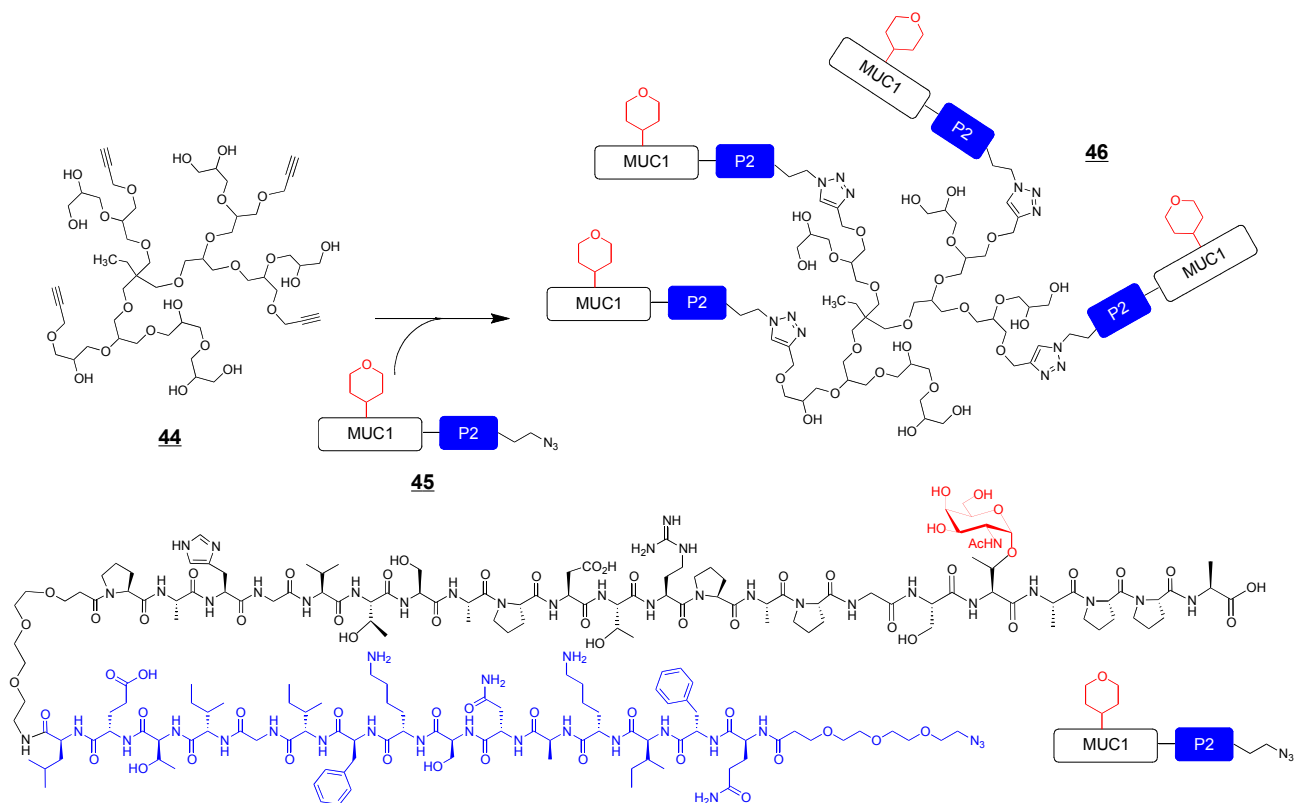


Schéma 9 : Conjugaison par CuAAC du dérivé de MUC1 45 sur la plateforme dendrimérique 44

La structure et la composition du vaccin **46** obtenu est confirmée par MALDI-TOF. La quantité d'anticorps induite par ce vaccin **46** en présence de CFA est importante, de plus les IgG produits sont très spécifiques des cellules tumorales humaines (MCF-7). Alors que l'épitope *T-cell dépendant* **P2** était incapable d'induire la production d'IgG dans une étude antérieure,^[81] sa présentation multivalente permet au système immunitaire de déclencher une immunité mémoire. Ainsi, il a été confirmé à travers ces expériences que la présentation des épitopes *B-cell* et *T-cell* sous forme multivalente renforce significativement l'immunogénicité intrinsèque du vaccin résultant.

Le groupe de Delmas^[82] a proposé une stratégie similaire, en synthétisant le vaccin **47** constitué de trois copies de la séquence MUC1 fonctionnalisée avec : *i*) l'antigène Tn₉ ; *ii*) l'antigène TF₉ ; *iii*) le peptide PADRE (*Figure 32*). La stratégie de synthèse est basée sur l'assemblage successif des différents glycopeptides par ligation oxime.

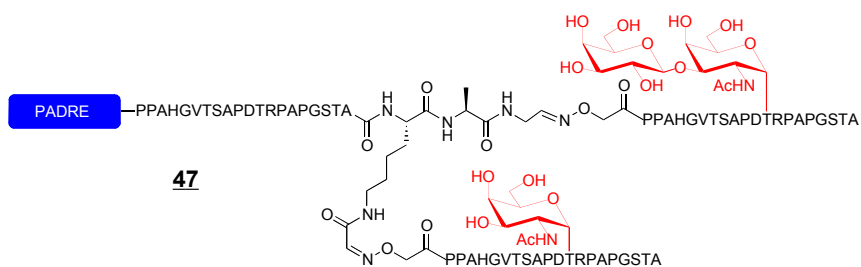


Figure 32 : Structure du candidat vaccin 47 décrit par le groupe de Delmas

Les souris immunisées avec le composé 47 en présence d'adjuvant produisent une forte quantité d'anticorps, principalement des IgG. Ces anticorps sont non seulement spécifiques des glycopeptides MUC1-Tn et MUC1-TF mais également vis-à-vis des cellules MCF-7.

Les groupes de Kunz et Li^[83] ont synthétisé des structures portant plusieurs copies d'épitope *B-cell* introduit sur le même lipopeptide immunogène. Le dérivé de Pam₃Cys 48 contenant quatre fonctions propargyles est synthétisé par SPPS puis conjugué par CuAAC avec les glycopeptides portant une fonction azoture complémentaire. Après purification par HPLC préparative, les vaccins ((Tn)-MUC1)₄-Pam₃Cys 49 et ((STn)-MUC1)₄-Pam₃Cys 50 sont obtenus et la structure est confirmée par spectroscopie de masse (*Schéma 10*).

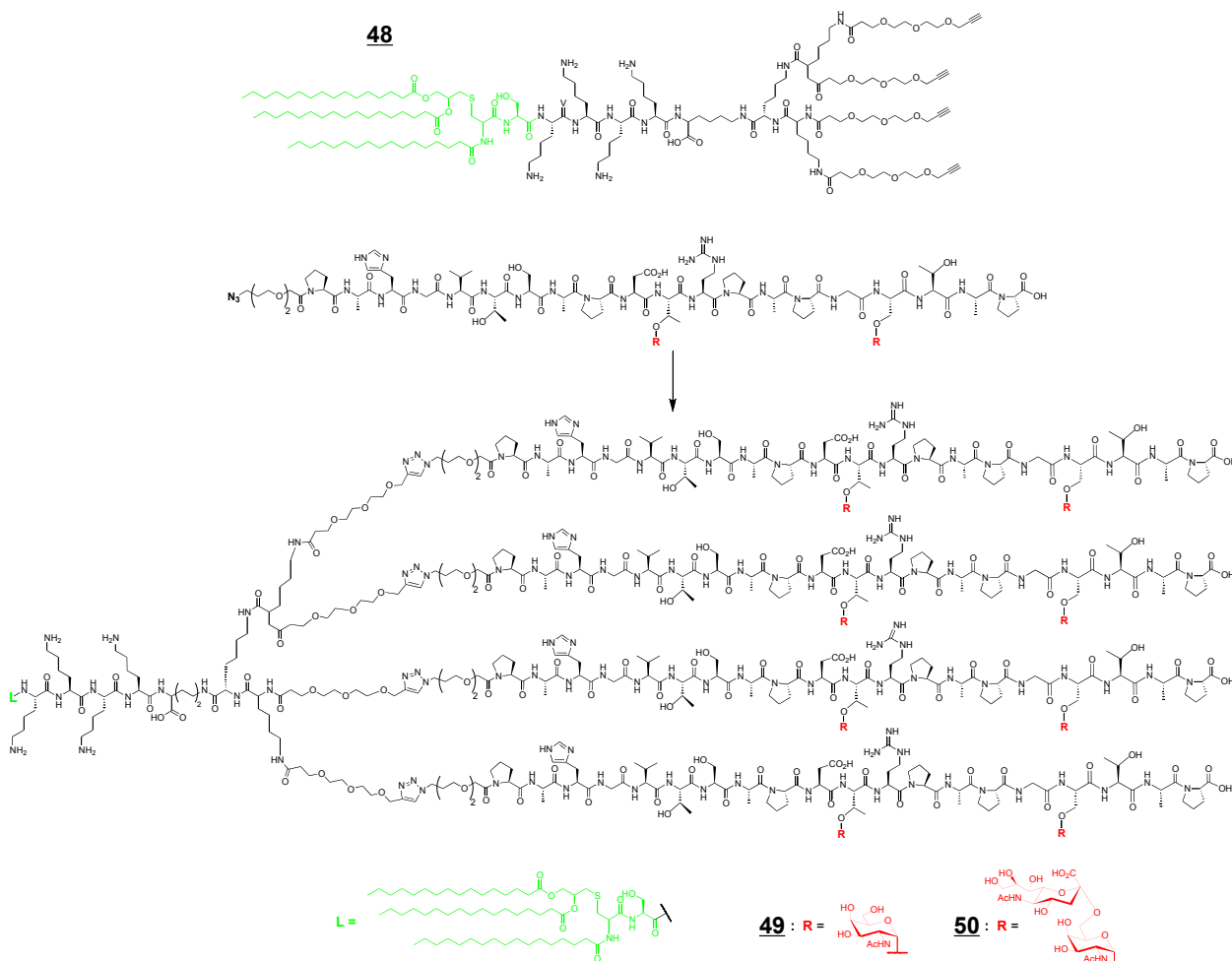


Schéma 10 : Synthèse des vaccins à deux composants ((Tn)-MUC1)₄-Pam₃Cys 49 et ((STn)-MUC1)₄-Pam₃Cys 50

Les tests d'immunisation de souris avec ces candidats vaccins ont été réalisés.^[84] Pour étudier des éventuels effets de multivalence, les composés monovalents (STn)-MUC1-Pam₃Cys et divalents ((STn)-MUC1)₂-Pam₃Cys portant respectivement une ou deux copies du glycopeptide analogue de MUC1 (*Schéma 10*), ont été utilisés comme molécules contrôle. La concentration d'anticorps induits (principalement des IgM) par le vaccin divalent est plus importante que dans le cas des composés monovalent et tétravalent **50**. Néanmoins, la quantité d'anticorps produit pour chacun des trois vaccins reste plus faible que lorsque le même glycopeptide est conjugué à une protéine porteuse (BSA). Pour expliquer le fait que le composé tétravalent soit moins immunogène que le divalent, les auteurs suggèrent que le lien triazole peut partiellement supprimer la réponse immunitaire dirigée contre les TACA. Cependant, des expériences complémentaires ont permis d'exclure cette hypothèse puisque aucune affinité particulière n'est observée entre les anticorps induits et le triazole. De plus, des expériences de cytométrie de flux ont permis de démontrer que les anticorps induits par le composé tétravalent ((Tn)-MUC1)₄-Pam₃Cys **49** ont plus d'affinité pour les cellules MCF-7. Enfin ces derniers sont capables d'initier une réponse CDC.

- *Conjugués MUC1-peptide*

Une autre approche entièrement synthétique consiste à assembler les différents épitopes de manière linéaire (bout-à-bout) sans utiliser de plateforme multivalente. Par exemple, le groupe de Kunz propose un vaccin entièrement synthétique basé sur le couplage covalent de la séquence répétitive MUC1 GVT**S**APDTRPAP portant l'antigène STn₆ avec un fragment peptidique issue de TTox (YSYF**S**SV) comme épitopes *T-cell*.^[85] Chaque épitope est synthétisé indépendamment puis sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'un linker PEGylé. Le vaccin synthétique **51** est isolé par HPLC préparative puis caractérisé par spectroscopie de masse et par RMN (*Figure 33*).

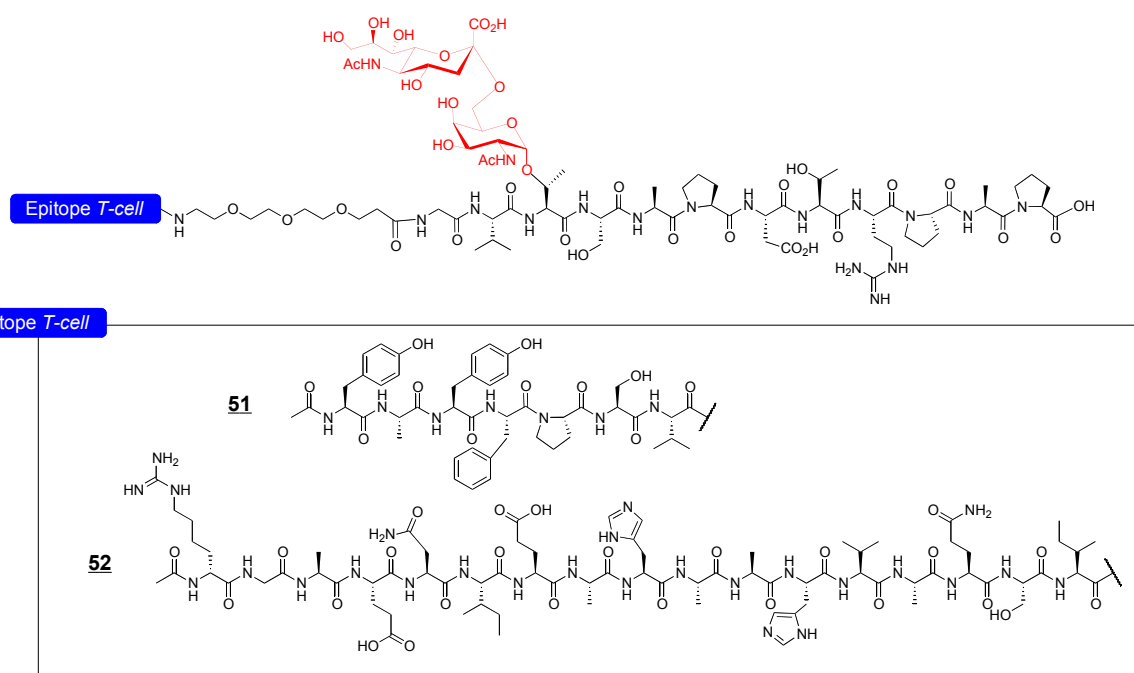


Figure 33 : Structure des vaccins à deux composants STn-MUC1-TTtox **51** et STn-MUC1-OVA **52**

Les analyses immunologiques montrent que le composé STn-MUC1-TTtox **51** stimule la prolifération des lymphocytes T CD3⁺ et CD8⁺, ce qui signifie que le vaccin est capable d'induire une réponse cytotoxique. Un vaccin similaire a ensuite été préparé en remplaçant l'épitope *T-cell* précédent par un fragment peptidique provenant de l'ovalbumine (OVA) (Figure 33).^[86] Le composé STn-MUC1-OVA **52** est co-administré chez trois souris avec l'adjuvant CFA. Seulement une souris parmi les trois immunisées montre une augmentation significative des anticorps dirigés contre STn-MUC1. Ce résultat est très inattendu car toutes les souris ont un patrimoine génétique quasiment identique, pourtant la réponse immunitaire diffère fortement entre chaque individu. Cependant, une nette augmentation de la quantité d'anticorps est observée entre la deuxième et la troisième immunisation. Les auteurs interprètent ce résultat comme l'acquisition d'une immunité mémoire obtenue par vaccination. Des études complémentaires ont permis de démontrer que les anticorps produits par STn-MUC1-OVA **52** n'ont pas d'affinité particulière pour des composés portant, soit la même séquence peptidique MUC1 sans antigène osidique, soit le même antigène osidique porté par une séquence peptidique différente (STn-MUC4). Ainsi, par cette expérience il a été démontré que les anticorps produits sont très spécifiques du glycopeptide STn-MUC1.

Dans le but de déterminer si la glycosylation d'une des trois régions répétitives de MUC1 (VT**S**AP, PD**T**RP et ST**A**PPA) a un effet bénéfique sur la réponse immunitaire induite, trois vaccins synthétiques constitués de la séquence répétitive HGV**T**SAPD**T**RPAPG**S**T**A**PPA glycosylée par un, deux ou trois marqueurs osidiques ont été préparés.^[87] Le composé mono-glycosylé **53** contient

l'antigène STn en position Thr₆ (STn₆), le composé di-glycosylé **54** contient STn₆ et Tn₁₆ et le composé tri-glycosylé **55** contient STn₆, Tn₁₆ et Tn₉ (Figure 34).

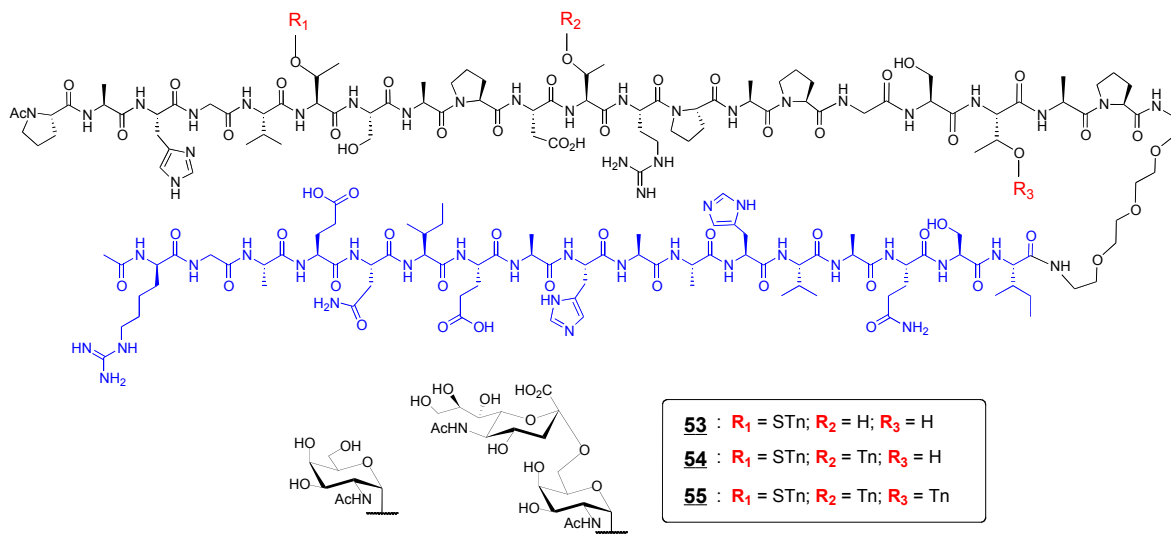


Figure 34 : Structure du composé mono-glycosylé **53**, di-glycosylé **54** et tri-glycosylé **55**

Ces trois glycopeptides sont conjugués au fragment peptidique OVA décrit précédemment, puis ces composés sont utilisés pour immuniser des souris en présence de CFA. Les souris immunisées respectivement avec le composé mono-glycosylé **53** et di-glycosylé **54** possèdent une forte concentration d'anticorps, en revanche aucune réponse immunitaire n'est observée pour les souris vaccinées avec le composé tri-glycosylé **55**. Ces résultats suggèrent que la glycosylation de la séquence répétitive PDTRP (c'est-à-dire Tn₉) diminue considérablement l'immunogénicité du glycoconjugué. Les auteurs démontrent également que les IgG produites par les souris immunisées par les vaccins mono-glycosylés **53** et di-glycosylés **54** sont hautement spécifiques de l'antigène osidique mais également de la séquence peptidique qui le porte, ce qui est en accord avec les observations réalisées dans l'expérience précédente.

Plus récemment, le même groupe a étudié l'influence du peptide immunostimulant sur la réponse *T-cell dépendante*.^[81] Pour cela, la séquence peptidique MUC1 HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA portant deux antigènes Tn (Thr₉ et Ser₁₅) est conjuguée à trois épitopes *T-cell dépendant* différents issus de la même protéine TTox: **P4** (TTox₁₂₇₃₋₁₂₈₄ : GQIGNDPNRDIL) **57**, **P2** (TTox₈₃₀₋₈₄₃ : QYIKANSKFIGITE) **56** et **P30** (TTox₉₄₇₋₉₆₇ : FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) **58** (Figure 35).

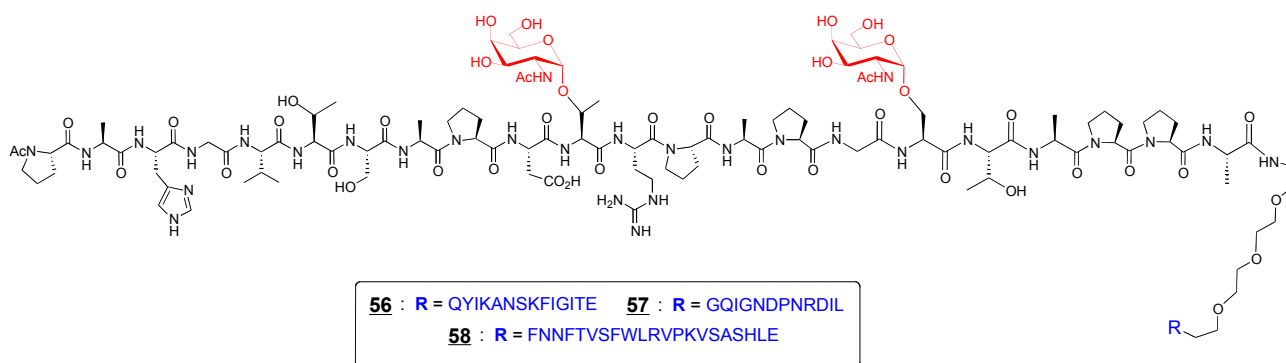


Figure 35 : Structures des vaccins à deux composants portant l'épitope *T-cell dépendant* P4 (TTox₁₂₇₃₋₁₂₈₄ : GQIGNDPNRDIL) **57, P2 (TTox₈₃₀₋₈₄₃ : QYIKANSKFIGITE) **56** ou P30 (TTox₉₄₇₋₉₆₇ : FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) **58****

Les souris immunisées avec le composé (Tn₉)-(Tn₁₅)-MUC1-**P30 58** induisent une forte réaction immunitaire comparée à ses homologues (Tn₉)-(Tn₁₅)-MUC1-**P2 56** et (Tn₉)-(Tn₁₅)-MUC1-**P4 57**. Les auteurs suggèrent que **P30** contient plus d'épitope *T-cell dépendant* que **P4** ou **P2** du fait de sa plus grande taille (20 résidus d'acides aminés contre 11 et 13 respectivement) ce qui va induire une réponse immunitaire de meilleure qualité.

- *Conjugués peptide-lipide*

Comme nous l'avons mentionné précédemment certains lipides sont des agonistes des TLR et peuvent activer le système immunitaire après liaison avec le récepteur. C'est en 1994 que Toyokuni et ses collaborateurs^[88] proposent le premier vaccin synthétique simplement constitué d'un dimère d'antigène Tn conjugué au lipide Pam₃Cys. Bien que la quantité d'IgG produite soit faible, cette étude montre qu'il est possible d'induire des anticorps dirigés contre l'antigène osidique, sans protéine porteuse ni peptide immunostimulant. Comme nous l'avons vu précédemment, ces conjugués peuvent former des auto-assemblages de type liposomes mais aucune des études suivantes n'ont mentionné ce phénomène. C'est la raison pour laquelle nous avons les conjugués peptide-lipide dans cette catégorie.

Le groupe de Kunz s'est inspiré de cette étude en conjuguant leur glycopeptide MUC1 (HGVT**S**APD**T**RPAPG**S**T**A**PPA) avec le lipopeptide Pam₃Cys.^[89] Ainsi, les vaccins Tn-MUC1-Pam₃Cys **59**, TF-MUC1-Pam₃Cys **60** et STn-MUC1-Pam₃Cys **61** ont été synthétisés en suivant la procédure décrite précédemment (*Figure 36*).

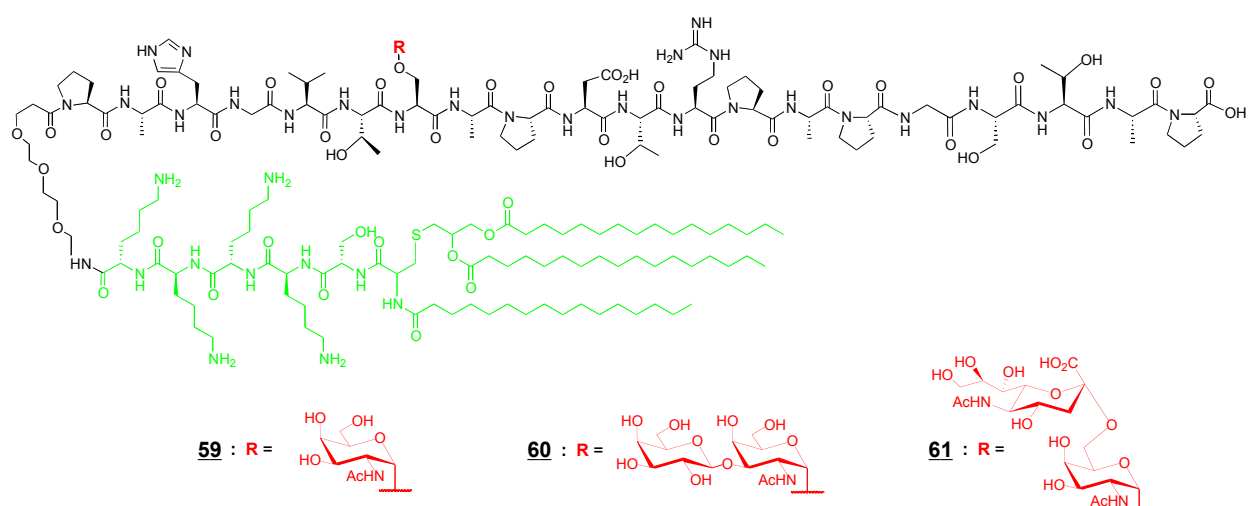


Figure 36 : Structure des candidats vaccins Tn-MUC1-Pam₃Cys 59, TF-MUC1-Pam₃Cys 60 et STn-MUC1-Pam₃Cys 61

Les souris immunisées avec le vaccin TF-MUC1-Pam₃Cys **60** (en absence d'adjuvant externe) induisent une réponse immunitaire modérée comparée au composé TF-MUC1-TTox constitué du même glycopeptide conjugué à une protéine porteuse. Les anticorps produits sont majoritairement des IgM qui sont capables de reconnaître spécifiquement le glycopeptide TF-MUC1, alors que la même séquence peptidique avec un antigène osidique différent ou le glycopeptide MUC4 ne sont pas reconnus.

En 2010 le groupe de Payne^[90] décrit la synthèse d'un vaccin synthétique à deux composants constitué de la séquence répétitive de MUC1 glycosylée sur les cinq positions disponibles et conjugué au lipopeptide Pam₃Cys. Un bras PEG flexible, polaire mais surtout non immunogène est utilisé comme linker pour relier les deux composants. La méthodologie qu'ils ont mise au point implique trois étapes : *i*) synthèse sur support solide du dérivé de Pam₃Cys portant le linker PEG ; *ii*) synthèse par SPPS du glycopeptide MUC1 fonctionnalisé par l'antigène Tn **63** ou TF **64** (ou non glycosylé **65**) ; *iii*) une réaction de condensation convergente permet d'obtenir le glycolipide désiré. Les composés (Tn)₅-MUC1-Pam₃Cys **63** et (TF)₅-MUC1-Pam₃Cys **64** représentent les premiers vaccins synthétiques où tous les sites potentiels de glycosylation sont occupés (Thr₄, Ser₅, Thr₉, Ser₁₅ et Thr₁₆) (Figure 37).

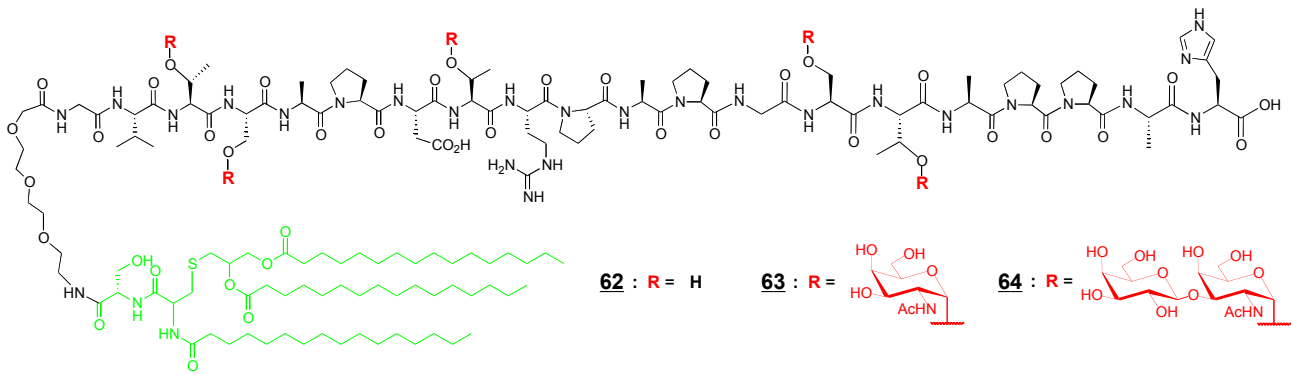


Figure 37 : Structure des composés (Tn)₅-MUC1-Pam₃Cys **62** et (TF)₅-MUC1-Pam₃Cys **64** développés par le groupe de Payne

Les tests immunologiques montrent que chaque souris vaccinée induit une forte réaction immunitaire avec production d'IgG. De manière très inattendue, c'est le vaccin non glycosylé MUC1-Pam₃Cys **65** qui possède la concentration en anticorps la plus élevée. Plusieurs aspects importants sont à retenir de ces expériences : *i*) la glycosylation complète de MUC1 semble réduire l'immunogénicité du vaccin ; *ii*) ces molécules ont des propriétés auto-adjuvantes puisque aucun adjuvant externe n'est employé pour immuniser les souris ; *iii*) aucun anticorps de type IgM n'est observé ce qui témoigne qu'une immunité mémoire a été acquise.

Le groupe de Danishefsky a également proposé de remplacer la protéine porteuse par le Pam₃Cys. Dans cette étude, deux composés présentant l'antigène Le^Y sous forme de monomère **65** ou de trimère **66** ont été conjugués à Pam₃Cys par couplage peptidique, *via* un térapeptide (AVAV) comme linker (Figure 38 et Figure 39).^{[91] [92]}

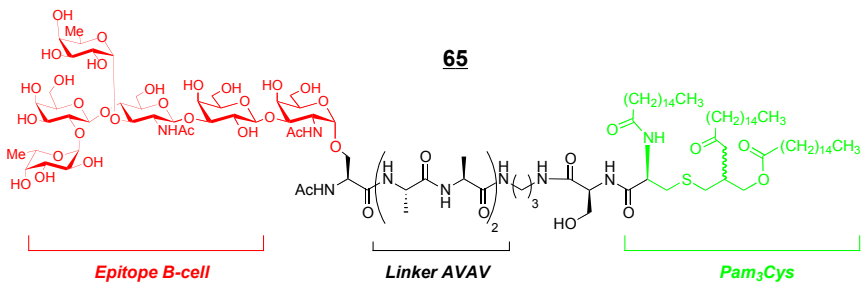


Figure 38 : Structure des vaccins à deux composants contenant un monomère de TACA conjugué à Pam₃Cys

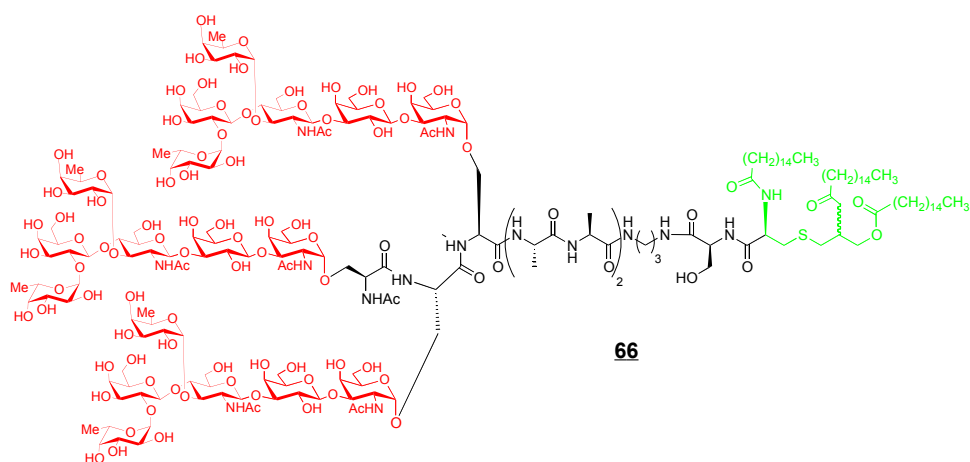


Figure 39 : Structure des vaccins à deux composants contenant un trimère de TACA conjugué à Pam₃Cys

Puis les composés (Le^Y)-Pam₃Cys **65** et (Le^Y)₃-Pam₃Cys **66** ont été injectés chez des souris en absence d'adjuvant.^[93] Le nombre d'anticorps produits par les souris vaccinées avec le trimère **66** est plus important que dans le cas du monomère **65**, cependant la présence d'IgG n'a été observée pour aucune des deux molécules. En revanche, lorsque l'antigène Le^Y est conjugué à une protéine porteuse (KLH) des IgM et des IgG sont produits. Par contre, si l'adjuvant QS-21 est co-injecté avec le composé (Le^Y)₃-Pam₃Cys **66** des IgM et des IgG sont observés. De la même manière, l'hétérocluster pentavalent contenant les marqueurs osidiques Globo-H, Le^Y, STn, TF et Tn conjugué au lipopeptide Pam₃Cys a été utilisé et des souris ont été vaccinées avec ce composé pentavalent **67** (Figure 40) en présence de QS-21. Dans ce cas, des IgM dirigées contre chacun des cinq TACA sont détectées.^[32]

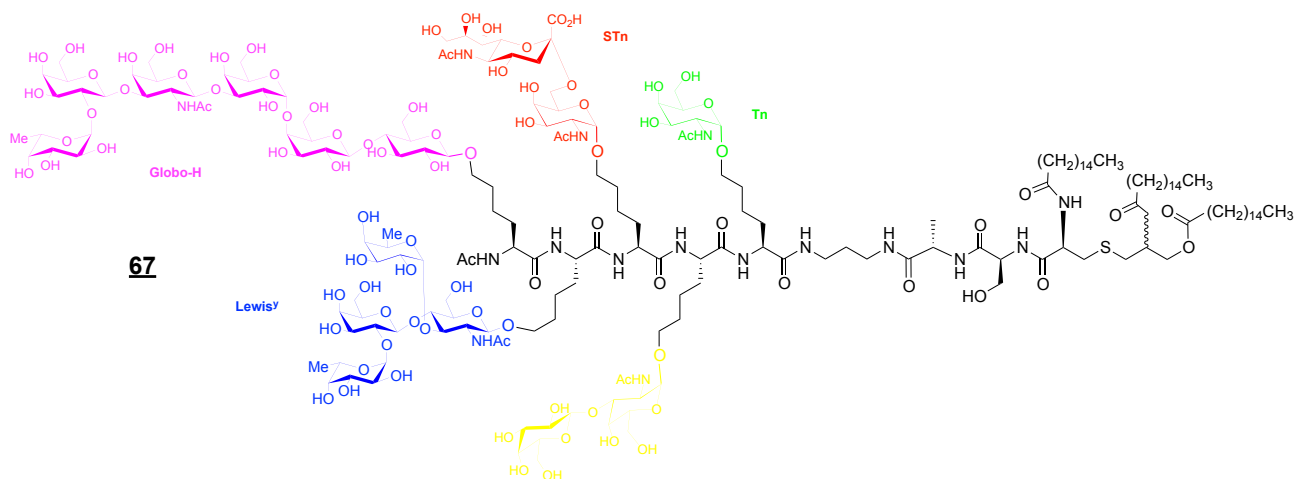


Figure 40 : Structure de l'hétérocluster pentavalent Tn, TF, STn, Globo-H et Le^Y conjugué à Pam₃Cys

Ces résultats sont plutôt décevants comparés à ceux obtenus avec des structures analogues utilisant KLH et montrent que l'utilisation de Pam₃Cys ne permet pas systématiquement de stimuler une

réponse auto-adjuvant. Cette étude suggère ici encore que les réponses obtenues sont très sensibles à la composition de candidat vaccin.^[94]

VI.A. Vaccins synthétiques à trois composants

Afin d'obtenir une réponse immunitaire complète, il semble judicieux d'associer les trois composants immunogènes décrits précédemment : un cluster de TACA (épitope *B-cell*), un fragment peptidique immunostimulant (épitope *T-cell*) et un lipopeptide (ligand TLR). Boons est l'un des premiers à avoir proposé ce type de molécule, comme nous l'avons mentionné dans la partie précédente. Sur ce même principe, le groupe de Kunz^[95] a décrit récemment le candidat vaccin (Tn₉)-(Tn₁₅)-MUC1-P2-Pam₃Cys **68** composé de la séquence MUC1 (HGVT**S**APD**T**RPAPG**S**TAP**A**) portant les antigènes Tn₉ et Tn₁₅, de l'épitope peptidique *T-cell* **P2** (TT**O**x₈₃₀₋₈₄₃ : QYIKANSKFIGITE), le tout conjugué par un lien thioéther au lipopeptide Pam₃Cys (*Figure 41*).

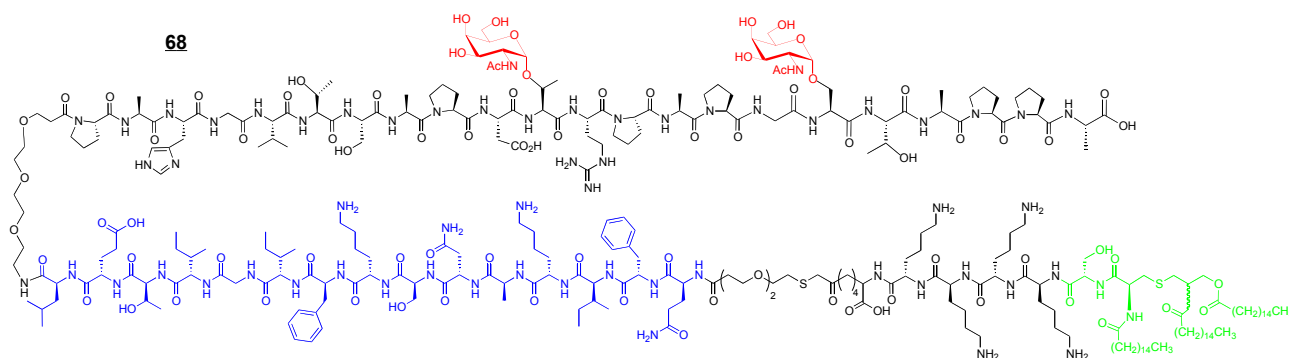


Figure 41 : Structure du vaccin à trois composants (Tn₉)-(Tn₁₅)-MUC1-P2-Pam₃Cys **68** proposé par le groupe de Kunz

L'étude des propriétés immunologiques de ce composé montre que les souris induisent une forte concentration d'IgM et d'IgG. En outre, ces anticorps sont capables de reconnaître les cellules tumorales MCF-7 et d'induire la lyse de type CDC. En plus de confirmer l'efficacité des vaccins à trois composants, ces résultats démontrent que le lien thioéther utilisé dans cette étude n'est pas immunogène.

Payne et ses collaborateurs ont également proposé des vaccins multi-épitopiques similaires, les composés (Tn)₅-MUC1-TTTox-Pam₃Cys **70** et (TF)₅-MUC1-TTTox-Pam₃Cys **71** (*Figure 42*) possédant le fragment peptidique (YSYFPSV) issu de TTTox entre la partie lipidique et le glycopeptide MUC1.^[96]

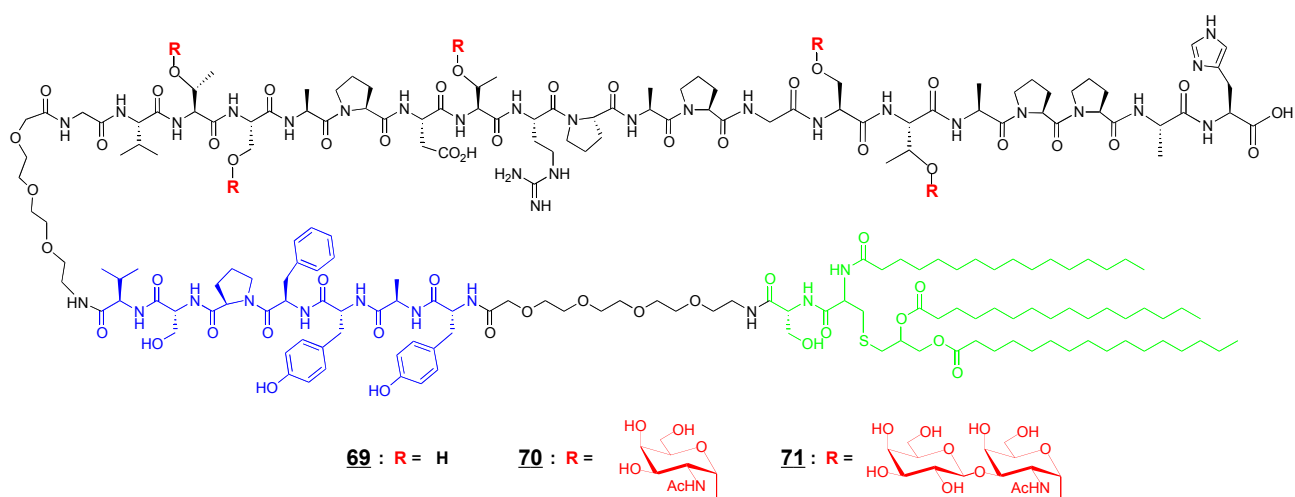


Figure 42 : Structure des vaccins à trois composants (Tn)₅-MUC1-TTox-Pam₃Cys 70 et (TF)₅-MUC1-TTox-Pam₃Cys 71 proposé par le groupe de Payne

Des souris ont été immunisées avec ces composés en absence d'adjuvant. Après la troisième immunisation, une forte concentration d'IgG a été détectée notamment pour MUC1-TTox-Pam₃Cys **69** et (TF)₅-MUC1-TTox-Pam₃Cys **71**. La réponse immunitaire observée est plus importante dans le cas des vaccins à trois composants que pour ceux à deux composants ((Tn)₅-MUC1-TTox-Pam₃Cys **70** et (TF)₅-MUC1-TTox-Pam₃Cys **71** *versus* (Tn)₅-MUC1-Pam₃Cys **63** et (TF)₅-MUC1-Pam₃Cys **64**) ce qui démontre que le couplage covalent des épitopes *B-cell*, *T-cell* et de Pam₃Cys est indispensable pour induire une réponse humorale très efficace. Les anticorps induits ont une bonne affinité et sélectivité pour les cellules tumorales MCF-7. Pour finir, les mêmes auteurs,^[97] ont remplacé le fragment peptidique de TTox par la séquence PADRE ((dA)K(Cha)VAAWTLKAA(dA)(Ahx)). Ici encore, des anticorps de haute affinité sont induits par les souris inoculées avec ce candidat vaccin en absence d'adjuvant. En outre, ces anticorps sont capables de reconnaître avec une grande spécificité les cellules MCF-7. Ces études montrent que les vaccins à trois composants sont capables d'induire la production d'anticorps de haute affinité en absence d'adjuvant, de protéine porteuse ou de formulation sous forme liposomale.

VII. Travaux antérieurs du laboratoire

1. Plate-forme « RAFT »

En se basant sur l'approche proposée par le groupe de C. Leclerc, l'équipe I₂BM du DCM de Grenoble a étudié l'utilisation d'un peptide cyclique comme plate-forme synthétique : le système RAFT (*Regioselectively Addressable Functionalised Template*).^[98] Ces plates-formes cyclodécapeptides ont été initialement décrites par Mutter pour la conception de protéines

artificielles.^{[99] [100]} Ces structures sont généralement composées de deux coudes proline-glycine de type β qui stabilisent la conformation du cyclodecapeptide en feuillet β anti-parallèle. Ce type de contrainte implique que les chaînes latérales des six autres acides aminés (généralement des lysines), soient orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle selon la distribution suivante :

- quatre lysines dans la partie supérieure dit « domaine de reconnaissance » (en bleu Figure 43)
- deux lysines dans la partie inférieure dit « domaine effecteur » (en rouge Figure 43)

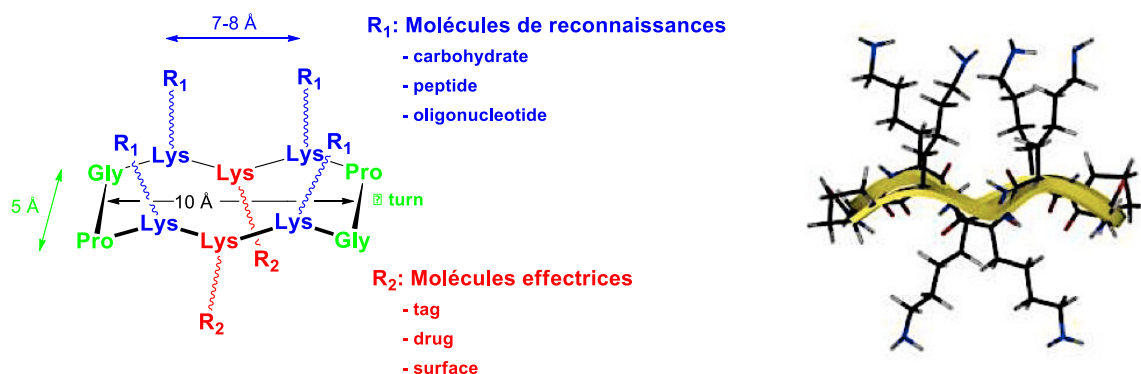


Figure 43 : Structure du cyclodecapeptide RAFT

Ces deux domaines peuvent être facilement décorés régiosélectivement grâce à l'utilisation de six lysines protégées orthogonalement. Ce type de châssis permet donc de contrôler la position et l'orientation des motifs assemblés. La nature cyclique de ce châssis offre d'autres avantages comme une stabilité accrue aux dégradations enzymatiques par rapport aux peptides linéaires.^[101]

VII.A. Vaccins synthétiques à deux composants

Une première génération de vaccin utilisant cette plate-forme^[102] a été développée en collaboration avec l'équipe de C. Leclerc (Institut Pasteur, Paris). Cette molécule conserve la même composition en antigène (Tn et PV) que le MAG mais avec une distribution différente autour du cyclopeptide. Ce châssis permet en effet de présenter la partie osidique de l'antigène Tn de manière multivalente d'un côté du cycle, et le peptide immunostimulant de l'autre côté (Figure 44).

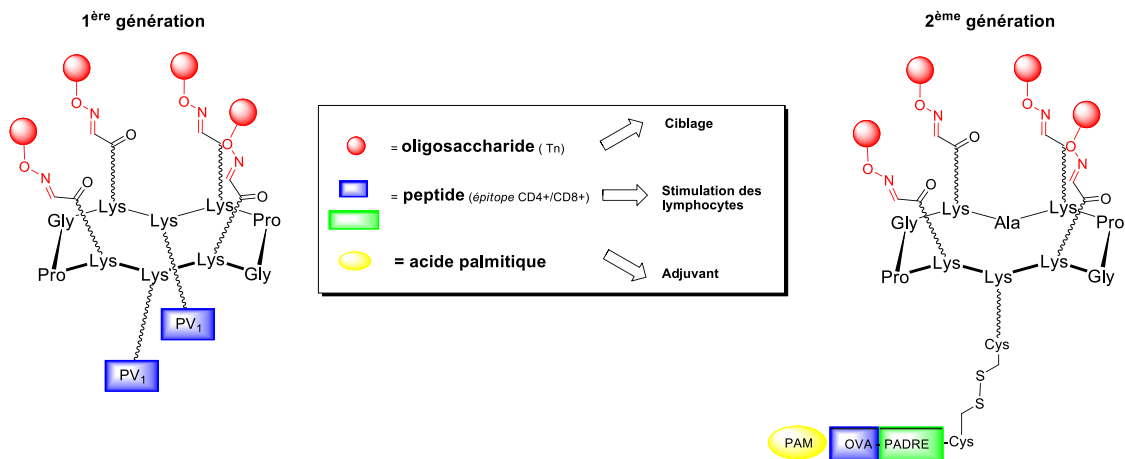


Figure 44 : Structure des vaccins de première et de deuxième génération préparés au laboratoire

Les études immunologiques ont tout d'abord permis de mettre en évidence que le cyclodecapeptide RAFT est une plate-forme faiblement immunogène, ce qui est un point crucial dans ce type d'approche. En effet, seulement 0,1 à 1% des IgG produites sont dirigées contre le cyclodecapeptide. De plus, l'immunisation de souris permet d'induire une réponse humorale à travers la production d'anticorps de haute affinité, capable de reconnaître les marqueurs osidiques Tn exprimés sur les cellules MCF-7. Cette dernière observation confirme également que la présentation de la partie osidique de l'antigène Tn, et non la structure native comme dans le MAG, permet de mimer efficacement cet antigène.

VII.B. Vaccins synthétiques à quatre composants

Sur la base de ces travaux encourageants et en collaboration avec l'équipe de BenMohamed (UCI, Irvine), nous avons modifié la structure et la composition de nos candidats vaccins pour améliorer leurs propriétés immunologiques. Nous avons tout d'abord constaté que dans la plupart des cas, les conjugués monovalents induisent une faible réponse immune. En effet, les marqueurs tumoraux doivent préférentiellement être présentés de manière multivalente afin de mimer les structures natives exprimées sur les tumeurs. Une telle présentation permet en effet de délivrer efficacement le vaccin aux APC par un mécanisme d'endocytose. De plus, comme nous l'avons vu dans de nombreux exemples précédents, des constructions présentant une densité en sucre élevée favorisent une réponse efficace et une production d'anticorps spécifiques des tumeurs exprimant les mêmes marqueurs osidiques. Outre la présence de cluster de TACA, celle d'épitopes peptidiques activant les lymphocytes $CD4^+$ est également nécessaire pour produire des plasmocytes, des IgG et des lymphocytes B mémoire. De plus, la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ semble également primordiale pour déclencher une réponse immunitaire efficace. Pour cela, comme nous l'avons mentionné plus haut, l'utilisation de fragments peptidiques issus de protéines exprimées par

les cellules cancéreuses (épitopes CD8⁺) comme antigène permettra une réponse cytotoxique dirigée contre ces cellules. De plus, l'initiation et le maintien de cette réponse CD8⁺ requiert également l'assistance des lymphocytes Th CD4⁺. Compte tenu de ces éléments, nous avons pensé qu'il serait judicieux d'ajouter une séquence peptidique apportant les épitopes CD8⁺ dans nos composés, pour induire une réponse humorale ET cellulaire. Enfin, les vaccins étant généralement délivrés en présence d'un adjuvant externe potentiellement toxique, nous avons conjugué l'acide palmitique à la molécule vaccinale. La partie lipidique devrait en effet conférer des propriétés auto-adjuvantes en stimulant les APC *via* les récepteurs TLR-2.

Cette nouvelle génération de vaccin à quatre composants a été décrite par notre équipe en 2008.^[103]^[104]^[105] Elle contient donc : *i*) un cluster d'antigène Tn ; *ii*) l'épitope *T-cell dépendant* PADRE, *iii*) un épitope CTL issu de l'ovalbumine (OVA₂₅₇₋₂₆₄) et *iv*) un acide palmitique lié à l'extrémité *N*-terminale de ce peptide (*Figure 44*). Les études immunologiques ont permis tout d'abord de confirmer l'efficacité des réponses *B*- et *T-cell dépendantes* attendues. De plus, des expériences d'immunisation de souris, avant ou après inoculation de tumeurs et avec ou sans administration d'adjuvant externe, se sont révélées extrêmement prometteuses. Nous avons en effet observé que l'association de ces 4 composants permet d'induire une régression tumorale corrélée à une augmentation spectaculaire du taux de survie chez la souris.

VIII. Notre projet

Sur la base de nos travaux antérieurs, notre projet a été de **développer des méthodologies de synthèse efficaces** pour accéder à des nouvelles générations de vaccin contre le cancer plus efficaces. Dans l'**Introduction** de ce manuscrit, nous décrivons les différents éléments structuraux à intégrer dans un candidat vaccin et les approches semi-synthétiques et synthétiques pour les préparer. L'analyse de ces données bibliographiques converge vers des points qui nous semblent essentiels de considérer pour ce projet.

Un premier élément important est l'étape de reconnaissance par les APC qui doit être optimale pour assurer une délivrance efficace. Dans le cas des vaccins à base de TACA, cette étape est assurée par des anticorps membranaires (les BCR) qui se regrouperont à la surface du lymphocyte B par un phénomène de « clustering » lors de sa liaison au TACA pour permettre l'internalisation du vaccin par endocytose. Comme dans la plupart des interactions multivalentes sucre-protéine, la géométrie, la structure et la valence du composé glycosylé jouent un rôle essentiel dans ce processus. Pour cette raison, notre travail s'est articulé en plusieurs parties. Dans le **Chapitre I**, nous nous sommes

intéressés à la **nature le lien chimique** qui permet de relier les TACA à notre structure porteuse cyclodécapeptidique tétravalente pour étudier l'influence de ce paramètre sur la présentation du vaccin aux BCR. Compte tenu du savoir-faire de notre laboratoire, nous avons pensé que les méthodes chimiosélectives offraient des outils parfaitement adaptés pour remplir cet objectif. Après une courte introduction générale portant notamment sur les méthodes utilisées au cours de ce travail (ligation oxime, cycloaddition de Huisgen couplage thiol-ène et couplage thiol-chloroacétyle), nous décrivons la synthèse des marqueurs osidiques Tn et TF et des plateformes peptidiques portant les fonctions chimiques adéquates. Les méthodes d'assemblage des plateformes tétravalentes glycosylées puis de conjugaison d'un peptide immunostimulant sont ensuite détaillées. Une dernière partie de ce chapitre porte sur la synthèse de vaccins analogues utilisant un mime de l'antigène Tn et sur la description des résultats immunologiques réalisés chez la souris.

Dans le **Chapitre II**, nous avons cherché à **augmenter la densité osidique** dans nos composés car ce paramètre influe en général fortement sur l'affinité des glycoconjugués vis-à-vis de leur cible. Après avoir abordé brièvement les interactions sucres-protéines et les phénomènes de multivalences associés, nous décrivons la synthèse de composés portant 16 antigènes osidiques par molécule en utilisant ici encore plusieurs méthodes de conjugaisons, en particulier une approche itérative et divergente basée sur la ligation oxime. Afin de valider les propriétés de reconnaissance sur ce type de dérivé, nous avons synthétisé des structures modèles présentant des motifs osidiques plus simples et étudié leur potentiel d'inhibition par test ELLA et mesuré leur affinité par ITC avec la lectine LecB de *Pseudomonas aeruginosa*. Compte tenu de son efficacité, nous avons testé la robustesse et les limites de cette méthode d'assemblage itérative. Pour cela, nous avons synthétisé et caractérisé une nouvelle série de composés présentant 64 copies de sucre et mesuré leur potentiel d'inhibition vis-à-vis de deux lectines végétales modèles. Enfin, un peptide chimère CD4⁺/CD8⁺ a été conjugué aux structures hexadécavalentes. Les candidats vaccins correspondants sont en cours d'évaluation immunologique.

Pour finir, des études récentes suggèrent que le vaccin « idéal » devrait combiner plusieurs d'antigènes osidiques dans la même molécule. En effet, la manière dont sont exprimés les marqueurs osidiques à la surface des cellules cancéreuses est un point important qui est très rarement considéré dans la conception de vaccins. En effet, plusieurs antigènes osidiques sont présents simultanément sur un même type de tumeurs et leur taux d'expression varie sensiblement au cours de l'évolution de la maladie. Par conséquent, il nous a semblé primordial de prendre cet élément en compte dans notre projet car ce type de vaccin devrait permettre d'induire une réponse immunitaire « multi-facettes » dirigée contre une large population de tumeurs et à différents stades

de la maladie. Ainsi, nous décrivons dans le **Chapitre III** la synthèse d'**hétéroglycoclusters de densité et composition variable en marqueurs osidiques**. Après une courte introduction bibliographique portant sur les méthodologies de synthèse d'hétéroglycoclusters, nous avons étudié l'orthogonalité de plusieurs méthodes chimiosélectives pour attacher différents antigènes osidiques dans une même molécule à des positions parfaitement définies. Certains composés ont ensuite été conjugués comme par exemple un peptide chimère CD4⁺/CD8⁺ (Figure 45).

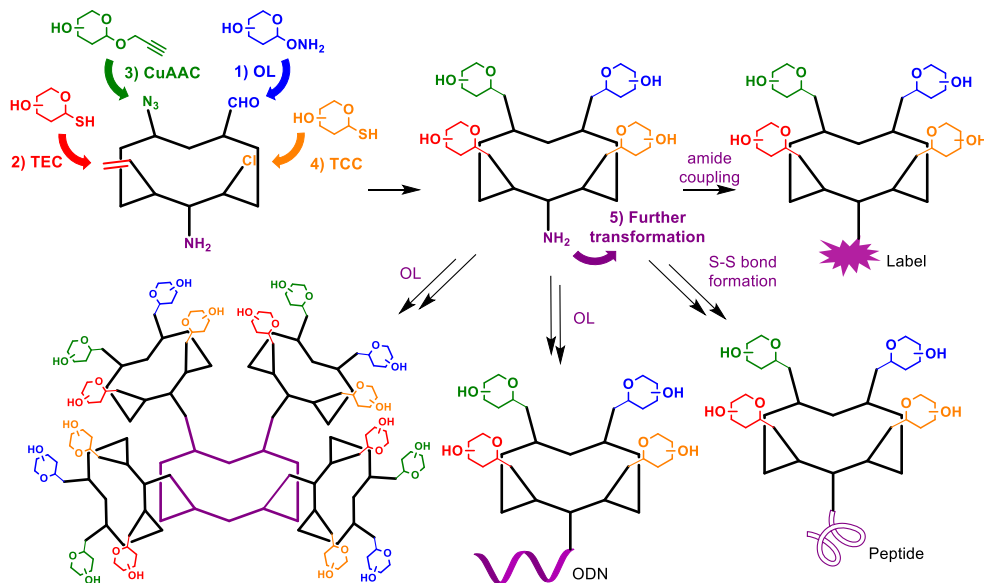


Figure 45 : Synthèse de vaccins multi-épitopiques

Chapitre II Synthèse d'homoglycoclusters tétravalents

Afin d'améliorer les propriétés immunologiques de nos candidats vaccins, le **premier objectif de mon projet** a été d'étudier l'influence du linker (espaceur) sucre-plateforme. En effet, ce paramètre est connu pour affecter fortement les interactions sucres/protéines et pourrait donc jouer un rôle important sur la reconnaissance du candidat vaccin par les lymphocytes B. Des effets de linker ont en effet été observés précédemment sur des vaccins synthétiques comme nous l'avons évoqué en Introduction. Pour cela, nous avons préparé plusieurs homoglycoclusters tétravalents en utilisant quatre méthodes de ligation chimiosélective différentes : la ligation oxime (OL, oxime ligation), la cycloaddition de Huisgen (CuAAC, copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition), le couplage thiol-ène (TEC, thiol-ene coupling) et le couplage thiol-chloroacétyle (TCC, thiol-chloroacetyl coupling). La synthèse de ces composés est réalisée en trois grandes étapes : *i*) préparation des marqueurs osidiques fonctionnalisés ; *ii*) préparation des cyclopeptides portant des fonctions d'ancrage complémentaires ; *iii*) assemblage chimiosélectif des deux partenaires. Ensuite, un peptide immunostimulant a été introduit sur la face inférieure du cyclodecapeptide selon la procédure décrite précédemment.

A. Stratégie de synthèse des glycoconjugués

1. Approche classique

Une stratégie de synthèse classique des *O*-glycopeptides consiste à coupler un saccharide protégé et correctement activé avec un acide aminé partiellement protégé (Schéma 11).^{[106] [107]}

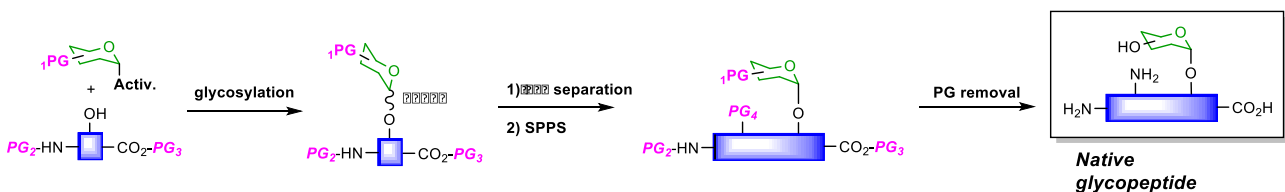


Schéma 11 : Approche classique

De nombreuses méthodes ont été développées pour synthétiser ce type de structure pour des applications en immunothérapie. On peut citer les travaux de H. Kunz qui utilise des dérivés halogénés et des sels d'argent comme promoteur^{[108] [109]} ou un dérivé de sialyl-xanthogénate pour accéder aux dérivés sialylés.^{[110] [85] [111]} Boons s'est inspiré des travaux de Van Boom et Van der

Marell^[112] et utilise la chimie des thioglycosides.^[113] Quant aux groupes de Danishefsky et Barchi, ils ont généralement recours à des sucres activés par un groupement trichloroacétimide^[114] et *n*-pentenyl^[115] respectivement. Même si ces approches permettent d'obtenir les glycopeptide attendus après SPPS, elles comportent deux inconvénients majeurs : *i*) la glycosylation du motif osidique doit être stéréo-sélective car la séparation des anomères α/β peut dans certains cas s'avérer délicate ; *ii*) les groupes protecteurs doivent être soigneusement choisis car ils peuvent non seulement influencer l'étape de glycosylation mais leurs clivages peut également entrainer des réactions non désirées.

I.A. Approches chimiosélectives

Les ligations chimiosélectives ont été en partie développées pour éviter ces différents problèmes. D'abord décrites pour le design de protéines artificielles,^[116] ces méthodes sont désormais couramment utilisées pour l'assemblage contrôlé de divers biomolécules (peptide, oligosaccharide et oligonucléotide). Elles ont en effet une régiosélectivité similaire à une réaction enzymatique et présentent en plus l'avantage d'être accessible à une plus grande variété de composés polyfonctionnels. Ces ligations consistent à coupler deux composés portant deux fonctions chimiques hautement réactives l'une envers l'autre (représentées schématiquement par X1 et X₂ sur la Schéma 12).

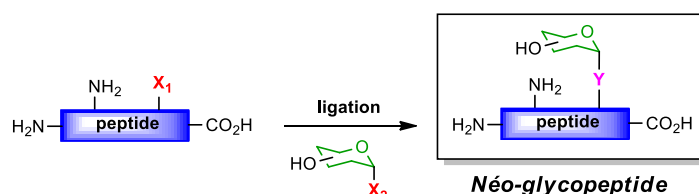




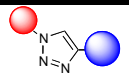

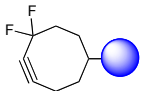
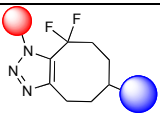

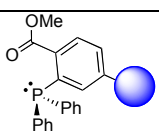
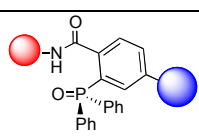

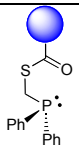
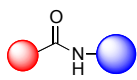
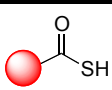

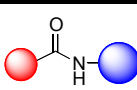
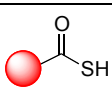
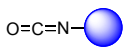
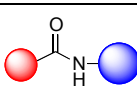
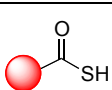
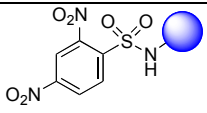
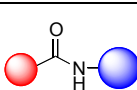
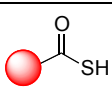
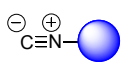
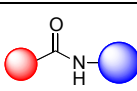
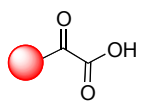
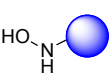
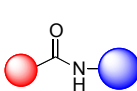
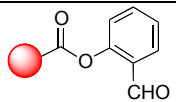
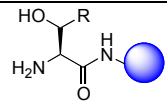
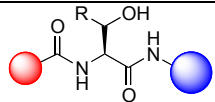
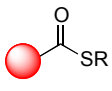
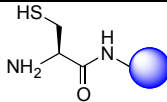
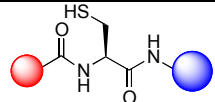
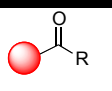
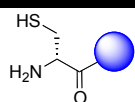
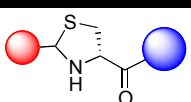
Schéma 12 : Approche chimiosélective

Dans le cas d'une glycopeptide, *aucun groupe protecteur* n'est nécessaire pour réaliser l'assemblage du sucre et du peptide car la réaction va impliquer uniquement ces deux fonctions complémentaires quelles que soient les fonctions chimiques présentes à proximité. De plus, aucun problème de *stéréosélectivité* n'est rencontré dans ce cas puisque car la configuration des deux partenaires est déjà définie avant le couplage qui conduit de ce fait à conjugué optiquement pur.

Ces réactions sont généralement réalisées dans l'eau et ne nécessitent pas l'utilisation de réactif de couplage pour conduire à des bioconjugués avec des rendements et des taux de pureté très élevés.

Un grand nombre de ligations chimiosélectives a été décrit à ce jour dans la littérature, dont la plus part proviennent de réaction connues depuis de nombreuses années en synthèse organique et qui

sont dorénavant appliquées aux biomolécules. La plupart de ces méthodes, que nous avons classifiées selon le réactif utilisé (azoture, thiol, carbonyle), le produit formé (lien amide) ou le type de réaction (cycloaddition Diels-Alder, métathèse) sont résumées dans le *Tableau 2* ci-dessous. Elles impliquent toutes des oligosaccharides et des peptides (ou protéines).

	Réactif A	Réactif B	Produit	Références
<i>CuAAC</i>				<i>Voir ci-dessous</i>
<i>Strain-induced cycloaddition</i>				[117] [118] [119] [120] [121]
<i>Staudinger ligation</i>				[122] [123] [124] [125] [126] [127]
<i>Traceless Staudinger</i>				[128] [129] [130]
<i>Thioacid/Azide</i>				[131] [132] [133] [134] [135]
<i>Thioacid/Isocyanate</i>				[136] [137]
<i>Thioacid/Sulfonamide</i>				[138] [139] [140] [141]
<i>Thioacid/Isonitrile</i>				[142] [143] [144] [145]
<i>KAHA ligation</i>				[146] [147] [148] [149] [150] [151] [152] [153] [154]
<i>Serine/threonine ligation</i>				[155] [156] [157] [158] [159] [160]
<i>Native chemical ligation</i>				[161] [162] [163] [164]
<i>Thiazolidine ligation</i>	 R = H ou alkyle			[165] [166] [167]

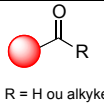
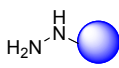
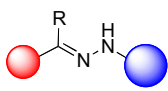
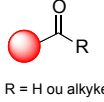
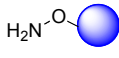
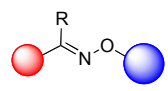
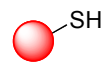
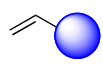
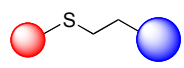
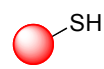
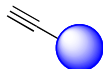
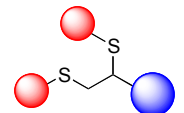
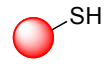
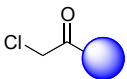
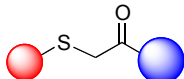
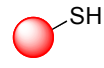
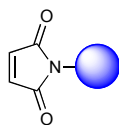
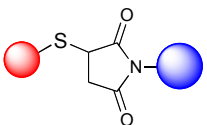
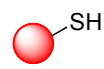
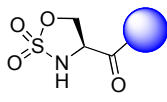
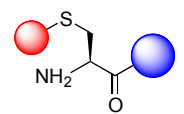
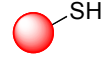

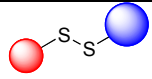
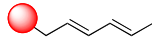
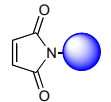
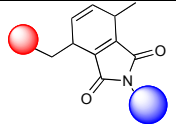
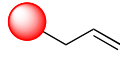

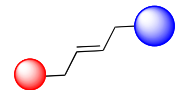
<i>Hydrazone ligation</i>	 R = H ou alkyle			[168] [169] [170] [171] [172]
<i>Oxime ligation</i>	 R = H ou alkyle			<i>Voir ci-dessous</i>
<i>Thiol-ene coupling</i>				<i>Voir ci-dessous</i>
<i>Thiol-yne coupling</i>				[173] [174] [175]
<i>Thiol/α-halocarbonyl</i>				<i>Voir ci-dessous</i>
<i>Thiol/maleimide</i>				[176] [177]
<i>Thiol/sulfamidate</i>				[178] [179]
<i>Disulfide</i>				[180] [181]
<i>Diels-Alder cycloaddition</i>				[182] [183] [184] [185]
<i>Cross-metathesis</i>				[186]

Tableau 2 : Résumé des différentes méthodes de ligations chimiosélectives décrites pour introduire un résidu osidique sur un peptide ou une protéine

Nous ne rentrerons pas plus dans le détail de ces méthodes dans ce manuscrit.^{[187] [188] [189] [190] [191]} Pour rester en adéquation avec le travail que nous avons réalisé, nous nous intéresserons plus particulièrement à la ligation oxime (OL, « oxime ligation »), la cycloaddition de Huisgen (CuAAC, «Cu(I)-catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition»), la thiol-ène (TEC, « thiol-ene coupling ») et la ligation thiol-chloroacétyle (TCC, « thiol-chloroacetyl coupling »). L'efficacité de chacune de ces méthodes sera illustrée par un exemple de synthèse d'analogues de glycopeptides ou de glycoconjugués multivalents.

- *Cu(I)-catalysed Azide-Alkyne 1,3-dipolar Cycloaddition (CuAAC)*

Historiquement découvert en 1893 par Michael^[192] puis explorée en 1967 par Huisgen,^[193] la cycloaddition 1,3-dipolaire est une réaction impliquant un alcyne et un azoture qui conduit à la formation d'un lien 1,2,3-triazole. Cependant, cette réaction est peu stéréospécifique car elle conduit à un mélange d'isomères 1,4- et 1,5-triazole et requiert des températures élevées. En 2002, le groupe de Meldal et celui de Fokin et Sharpless, découvrent simultanément une variante de cette réaction la CuAAC dans laquelle l'addition de cuivre I catalyse la formation régiosélective du triazole 1,4-disubstitué à température ambiante.^{[194] [195]} Un peu plus tard, la première bioconjugaison d'un fluorophore sur la capsid d'un virus par cycloaddition^[196] montre que cette réaction est réalisable dans l'eau et ouvre ainsi un vaste champ d'application en chimie des biomolécules^{[197] [198] [199] [200] [201] [202] [203]}. La CuAAC est une réaction délicate à mettre en œuvre car son efficacité dépend de nombreux paramètres réactionnels. Par exemple, les ions Cu (I) peuvent être obtenus selon plusieurs méthodes comme l'oxydation de Cu(0), apporté sous formes de copeaux^[204] ou de nanoparticules^[205], ou l'utilisation de sels de Cu(I) qui requiert la présence de base pour faciliter la formation du complexe Cu-acétylide, intermédiaire clé du mécanisme de cette réaction.^{[206] [207]} Cependant, la procédure la plus employée consiste à utiliser une source de cuivre II, généralement du CuSO₄, en présence d'un réducteur comme de l'ascorbate de sodium ou du TCEP (tris-(carboxyethyl)-phosphine) qui permettra de réduire *in situ* le Cu(II) en Cu(I). De plus, même si la CuAAC ne nécessite pas l'addition de ligand chélateur de cuivre, l'utilisation de TBTA (tris-(benzyltriazolylméthyle)amine) ou le THPTA (tris-(3-hydroxypropyltriazolylméthyle)amine) permet d'accélérer la cinétique de la réaction et maintient le cuivre au degré d'oxydation I.^[208]

En 2012, l'équipe de Brimble reporte la synthèse d'un analogue du glycopeptide MUC-1 en utilisant la CuAAC.^[209] Le *N*-acétyl-D-glucosamine **72** équipé avec trois bras propargyl sert ici de molécule centrale qui va être engagée dans deux réactions de cycloaddition successives. La première réaction permet de former le complexe saccharidique multivalent **73** sous irradiation microondes (100 W) en présence de sulfate de cuivre penta hydraté (CuSO₄.5H₂O) et de l'ascorbate de sodium (*Schéma 13*).

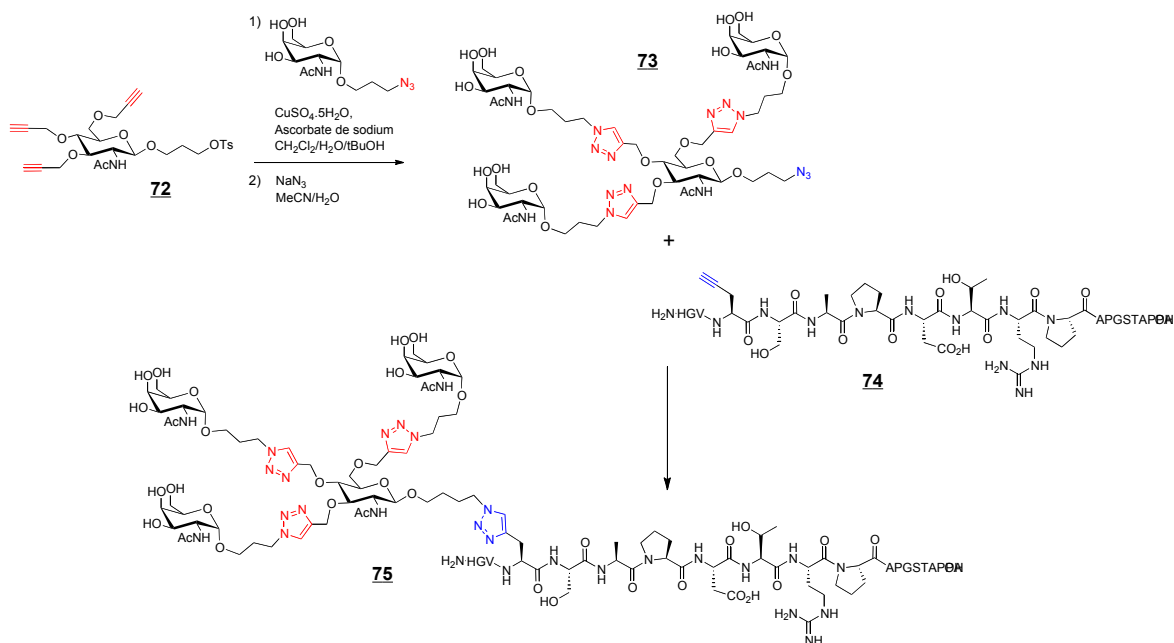


Schéma 13 : Préparation du néoglycopeptide **75** par cycloaddition entre le dérivé osidique **73** et le séquence peptidique **74**

La seconde cycloaddition permet de conjuguer ce dernier sur la séquence peptidique dérivée de MUC-1 **74** où un résidu Thr est substitué par un propargyl. Cette réaction est effectuée en présence de TCEP et non plus d'ascorbate de sodium^[210] pour éviter la formation de déshydroascorbate pouvant potentiellement réagir avec des résidus lysines ou arginines entraînant des réactions secondaires et la formation d'agrégats.^[211] Le néoglycopeptide **75** attendu est obtenu avec un rendement modeste de l'ordre de 40%.

La CuAAC comporte de nombreux avantages, notamment les groupements alcyne et azoture sont introduits sans difficulté particulière sur des biomolécules, de plus ils sont stables dans les solvants aqueux et inertes vis-à-vis des autres fonctions pouvant être rencontrées (thiol, amine, alcool, etc). En revanche l'utilisation de cuivre engendre deux inconvénients majeurs : la présence d'une quantité même catalytique de cuivre peut entraîner la formation d'espèce réactive de l'oxygène (*reactive oxygen species ROS*).^{[212] [208]} Cependant, cet obstacle peut être parfois surmonté par l'utilisation de ligand chélateur, par des temps de réaction plus courts et en se plaçant dans des conditions anaérobies. De plus, l'utilisation de cuivre pose également de nombreux problèmes lorsque l'on envisage de réaliser des applications *in vivo*, car il est potentiellement toxique pour les organismes vivants au-delà d'un certain seuil de tolérance.

- *Ligation Oxime (OL)*

Contrairement à la réaction entre une amine et un carbonyle qui conduit à la formation d'une base de Schiff, la réactivité devient radicalement différente si une oxyamine est utilisée comme

nucléophile. Par exemple, en milieu acide un groupement carbonyle réagit avec une amine primaire pour former une imine réversible, cependant l'équilibre est déplacé dans ces conditions en faveur du carbonyle libre. En revanche, lorsque l'on remplace l'amine primaire par une oxyamine, l'équilibre est déplacé en faveur de l'oxime. Ceci est dû à l'effet alpha qui rends l'atome d'azote de l'oxyamine *moins basique* mais *plus nucléophile* comparé à un groupement amine. De plus, le pH optimal pour ces réactions étant compris entre vers pH 3-4, l'azote d'une amine primaire est protonnée contrairement à celui de l'oxyamine, ce qui exacerbe la chimiosélectivité de cette approche.^[213] Un autre facteur qu'il est important de prendre en compte est la nature du carbonyle, qui joue un rôle majeur sur la stabilité du produit de la réaction de condensation. Il a ainsi été démontré que les aldéhydes aromatiques et glyoxyliques sont les carbonyles les plus appropriés pour réaliser ce type de ligation.^{[169] [214]}

C'est Rose^[116] qui dans les années 1990 ont réalisés pour la première fois la synthèse d'un dendrimère de taille conséquente (20 kDa) en utilisant la ligation oxime. Cette stratégie a ensuite servie pour de nombreuses applications dans le domaine des biomolécules comme la synthèse de peptide cyclique^[215], de protéines,^[216] d'oligonucléotide conjugués^[217] ou de glycoconjugués.^[218]

En 2001 l'équipe de Bertozzi^[219] réalise la synthèse d'un mime de mucine contenant un cluster d'antigène Tn ou STn en utilisant la ligation oxime (*Schéma 14*). Pour cela, plusieurs composés ont été préparés : *i*) deux fragments peptidiques issus d'une séquence de mucine **76** portant des fonctions cétone à la place des Ser et Thr ; *ii*) l'antigène tumoral Tn **77** (ou STn) portant en position anomérique la fonction oxyamine complémentaire. La ligation entre les différents partenaires est réalisée dans un tampon acétate (pH 5,5) en présence d'un excès de sucre oxyamine pour obtenir au bout de 24h le glycopeptide **78** avec des rendements de 60-70% après purification par HPLC (*Schéma 14*).

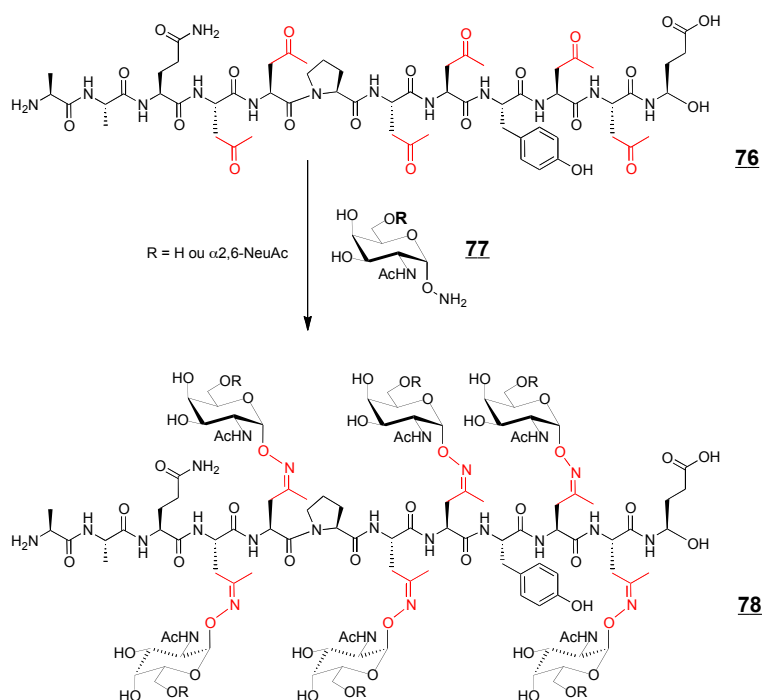


Schéma 14 : Synthèse du mime de mucine 78 par ligation oxime

Le principal inconvénient de cette méthode réside dans sa stabilité en milieu aqueux. Tam^[220] et Rose^[221] ont montré que démontré que les oximes sont stables en milieu acide (pH 3,5) et physiologique (pH 7), cependant des réactions d'hydrolyses ou de fragmentation de type « Kemp »^[222] sont observées à pH 9. Cependant, l'utilisation d'aldéhydes glyoxyliques permet d'augmenter très sensiblement leur stabilité. Une autre difficulté liée à cette chimie est la préparation des dérivés oxyaminés qui peut être problématique, notamment en raison de leur forte réactivité avec les composés carbonyles.

- *Ligation thiol-chloroacétyle (TCC)*

Les groupements sulfhydryles sont capables de réagir avec une variété d'électrophiles comme des halogénoacétyles pour former le thioéther correspondant par une réaction de SN₂. Cette réaction est réalisée dans l'eau à pH proche de 7, de telle sorte que le milieu soit favorable à la formation du thiolate. Comme les thiolates sont d'excellent nucléophiles, les ligations impliquant des thiols sont parfaitement compatibles avec des biomolécules.^[190]

Initialement utilisée pour le couplage de fragments peptidiques pour préparer des protéines synthétiques ou des peptides cycliques,^{[223] [224]} cette stratégie a ensuite été appliquée à la chimie des glycoconjugués.^{[225] [226]} Les récepteurs à mannose (ou DC-SIGN voir *Introduction*) sont des protéines qui vont permettre de délivrer l'antigène aux cellules dendritiques et ainsi d'activer le système immunitaire. Il a été largement reporté dans la littérature que ces protéines ont une

meilleure affinité pour les microorganismes ou les biomolécules présentant plusieurs mannoses de manière multivalente. Ainsi, dans le but de créer des nouveaux vaccins synthétiques Grandjean et ses collaborateurs^[226] ^[225] ont synthétisé le glycodendrimère **81** selon une stratégie basée sur la ligation entre le dendrimère **79** et les sucres mannoses **80** (*Schéma 15*).

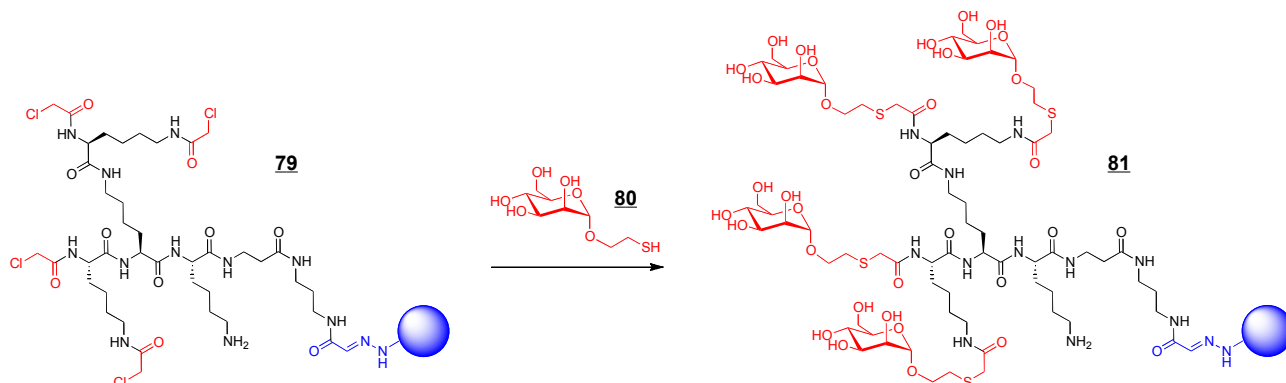


Schéma 15 : Synthèse du vaccin tétravalent **81 portant un cluster de mannose introduit par TCC**

La réaction de couplage a été effectuée à pH 8 et le glycoconjugué **81** portant 4 unités osidiques est obtenu avec un rendement de 41% (sur deux étapes) après purification par HPLC.

Le principal inconvénient de cette approche est la faculté des thiols à s'oxyder pour créer des homodimères. Elle nécessite donc de travailler dans des conditions optimales (en absence d'oxygène notamment) pour minimiser ce type de réaction secondaire et la perte d'une grande quantité du dérivé thiolé.

- *Couplage thiol-ène (TEC)*

Il y a plus d'un siècle, Posner^[227] décrit pour la première fois la réaction entre un alcène terminal et un thiol pour former le thioéther. Cette réaction portera plus tard le nom de *Thiol-ene coupling* (TEC). Le mécanisme de la réaction a été élucidé des années plus tard par Kharasch.^[228] Il débute par la formation d'un radical thiol qui est généré par irradiation lumineuse ou/et par l'action d'un photo-initiateur. Ce radical thiol, va être additionné sur l'alcène suivant des règles anti-Markovnikov pour former l'espèce radicalaire (*Schéma 16*). Ce dernier va capter un hydrogène radicalaire du thiol n'ayant pas encore réagi pour conduire à la formation du thioéther et du radical thiol initial qui va permettre la propagation du cycle radicalaire représenté *Schéma 16*.

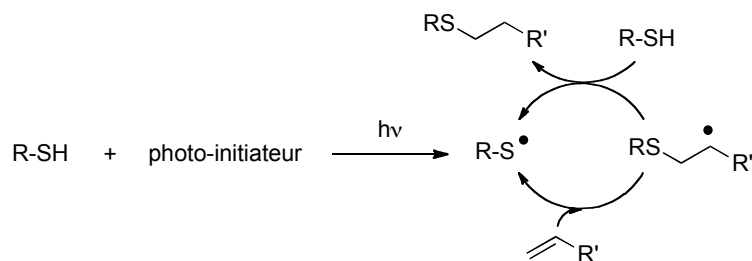


Schéma 16 : Mécanisme radicalaire proposé pour la réaction de *Thiol-ene coupling* (TEC)

L'avantage de la TEC est qu'elle peut être réalisée en présence d'oxygène avec une totale économie d'atome et une cinétique rapide. Cette réaction est effectuée à température ambiante, en absence de solvant, dans un solvant aqueux ou dans l'eau distillée.^[174] Cette stratégie est aussi intéressante car aucun catalyseur potentiellement coûteux ou toxique n'est nécessaire. Elle consiste simplement en une irradiation à une longueur d'onde de 365 nm, conditions compatibles avec les biomolécules telles que les sucres ou les peptides.

Depuis sa découverte la TEC a été utilisée pour de nombreuses applications, notamment pour la fonctionnalisation de polymères ou pour la préparation de dendrimères.^[229] Un intérêt particulier c'est porté également sur la synthèse de glycoclusters à base notamment de calix[4]arènes,^[230] cyclodextrines^[231], dendrimère,^{[232] [233]} polymère^[234] ou silsesquioxane.^[235] Par exemple, le groupe de Dondoni et Marra décrit la synthèse de glycolalix[4]arènes tétravalents.^[230] Ces derniers sont obtenus à partir du calixarène **82** portant sur sa face supérieure 4 doubles liaisons et du β -D-Glucose-SH péréacétylé **83** (Schéma 17).

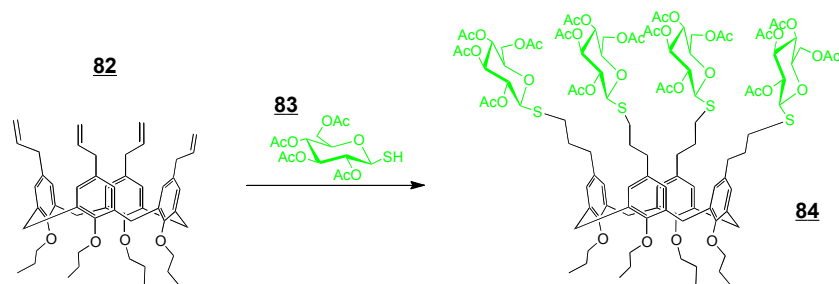


Schéma 17 : Introduction du Glu sur la face supérieur d'un calix[4]arènes par TEC

La réaction de conjugaison a été réalisée dans un mélange DMF/H₂O, sous irradiation à 365 nm en présence de DPAP comme photo-initiateur, pour donner le composé **84** avec un rendement isolé de 78%.

Il faut noter que cette réaction peut également être effectuée sur un groupement alcyne^{[236] [174]} pour conduire à une double hydrothiolation (TYC, Thiol-yne coupling). Dans ce cas, une même unité sucre est conjuguée en double exemplaire sur le même linker en une seule réaction. En revanche,

cette réaction conduit à la formation d'un centre asymétrique par linker, ce qui peut être problématique pour l'analyse des propriétés de reconnaissance biologiques.

D'une manière générale, ces réactions TCC et TYC présentent ici encore des inconvénients liés à la formation rapide de ponts disulfures (voir partie TCC). Ce phénomène est d'ailleurs renforcé par la nécessité d'utiliser le thiol en large excès et le passage par un mécanisme radicalaire qui favorise ce type de réaction secondaire.

II. Synthèse des motifs osidiques modifiés

Depuis quelques décennies de nombreuses études ont porté sur le développement de synthèses de marqueurs osidiques complexes comme le Globo-H ou l'antigène Lewis^Y.^[237] ^[17] L'architecture ramifiée de ce type de structure, la diversité des liens glycosidiques rencontrés (configuration α ou β à chaque connexion) et la présence d'un grand nombre de sites de réactivité variable sont autant d'éléments difficiles à maîtriser. Leur obtention nécessite de nombreuses étapes (protections / déprotections, activations) et les purifications sont généralement longues et parfois difficiles. Par conséquent, les conditions opératoires utilisées ainsi que la nature des groupes protecteurs et activateurs représentent des paramètres d'optimisation cruciaux dans la synthèse d'oligosaccharides.

Pour éviter des synthèses longues et fastidieuses, nous nous sommes intéressés au cours de notre projet aux TACA de structure relativement simple comme l'antigène Tn (monosaccharide) et TF (disaccharide). La stratégie d'assemblage chimiosélective que nous utilisons pour nos glycoconjugués nécessite l'introduction d'un groupe fonctionnel – une oxyamine, thiol ou propargyl– directement en position anomère du sucre. Les marqueurs osidiques Tn et TF en série oxyamine ont été synthétisés selon une procédure décrite au laboratoire^[238] qui repose sur la glycosylation d'un donneur de glycosyle fluoré par un groupement N-hydroxyphthalimide. Même si ces composés ont été resynthétisés pendant ma thèse, les protocoles ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. De la même manière, la synthèse de l'antigène Tn en série thiol a été réalisée par Michele Fiore pendant son post-doctorat. En revanche, les dérivés propargylés ont été obtenus selon une nouvelle stratégie de synthèse décrite ci-dessous.

1. Méthodologies de synthèse de sucres propargylés

Comme nous l'avons mentionné dans la partie précédente, la méthode CuAAC est une ligation très utilisée pour la conjugaison de biomolécules. Pour cela, nous avons décidé d'intégrer la fonction

azoture directement sur le cyclodécapeptide et la fonction alcyne sur la partie saccharidique. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la synthèse de motifs osidiques simples (galactose, glucose, mannose, fucose et lactose) portant une fonction alcyne, car non seulement ces sucres sont bon marché mais aussi parce que de nombreuses applications sont envisageables avec ce type de structure. La première synthèse de dérivé osidique portant une fonction propargyl remonte au début des années 1940^[239] où du bromure de tétraacétyl glucopyrannosyle a été glycosylé avec de l'alcool propargylique. Des années plus tard, le groupe de Mukhopadhyay^[240] propose une nouvelle voie de synthèse basée sur une glycosylation de type Fisher à partir de sucre libre et en présence de H₂SO₄-Silice. Selon les auteurs, les sucres propargylés désirés sont synthétisés avec des rendements élevés et une excellente stéréosélectivité. Cependant, quelques années plus tard, le groupe de Fairbanks^[241] rapporte des problèmes de reproductibilité concernant cette étude. En effet ils démontrent que non seulement les conditions expérimentales ne sont pas optimales (quantité de H₂SO₄-Silice utilisé, temps et température de réaction, etc), mais les rendements sont également considérablement moins élevés que ceux décrits et des mélanges d'anomères sont généralement obtenus. En 2006, l'équipe de Riguera^[242] propose une nouvelle stratégie utilisant un sucre donneur acétylé, activé par un trichloroacétimide et du BF₃.OEt₂ comme promoteur. Les produits propargylés sont obtenus avec de très bons rendements et une excellente stéréosélectivité grâce à l'assistance anchimérique en position C-2. Enfin, le groupe de Mereyala^[243] propose une synthèse à partir de sucre per-acétylé utilisé directement avec de l'alcool propargylique en présence de BF₃.OEt. Cette procédure très classique permet de s'affranchir de l'activation du sucre donneur et conduit généralement à un produit stéréosélectivement pur si le produit de départ l'est également par un mécanisme de type SN₁.

Nous avons suivi cette méthode de synthèse pour obtenir les dérivés α -Man (70%), α -Fuc (60%), β -Gal (85%) et β -Lac (78%) (*Figure 46*).

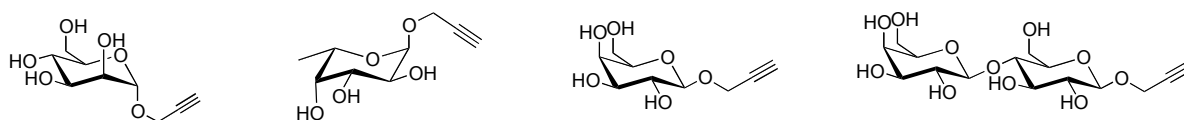


Figure 46 : Structure des résidus propargylés α -Man, α -Fuc, β -Gal et β -Lac

Toutefois, cette méthode ne nous a pas semblé applicable pour la synthèse des antigènes Tn et TF qui doivent présenter un lien alpha glycosidique.

II.A. Synthèse de l'antigène Tn en série propargylée

Plusieurs synthèses de l'antigène propargylé **87** ont déjà été décrites selon les différents protocoles expérimentaux mentionnés plus haut (*Tableau 3*).

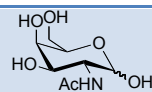
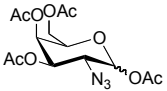
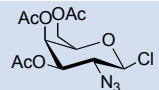
Entrée	Produit de départ	Conditions	Ratio α/β	Rendements
1 ^[241]		H ₂ SO ₄ /Silice HO-C≡CH	3 : 2	31%
2 ^{[244] [245]}		i) BF ₃ ·OEt ₂ HO-C≡CH ii) Zn/AcOH puis AC ₂ O/Pyr	4,5 : 1	26%
3 ^[246]		i) Ag ₂ CO ₃ /AgOCl ₄ HO-C≡CH ii) AcSH/Pyr	5 : 1	20%

Tableau 3 : Résumé des différents protocoles expérimentaux reportés dans la littérature pour préparer le dérivé **87**

Les méthodes de glycosylation à partir du dérivé chloré ou acétylé sont les moins efficaces puisque des rendements de l'ordre de 20-26% sont observés. L'utilisation de la silice activée semble plus adéquate même si la formation d'un mélange anomérique nécessite une étape d'acétylation pour pouvoir séparer les stéréoisomères formés.

Nous avons alors décidé de développer une méthode alternative pour préparer ce dérivé. La synthèse du marqueur tumoral Tn en série oxyamine passe par le dérivé fluoré **86** (*Schéma 18*). Cet intermédiaire étant un donneur de glycosyle stable et très réactif, nous avons choisi de l'utiliser pour préparer l'antigène Tn en série propargyle.

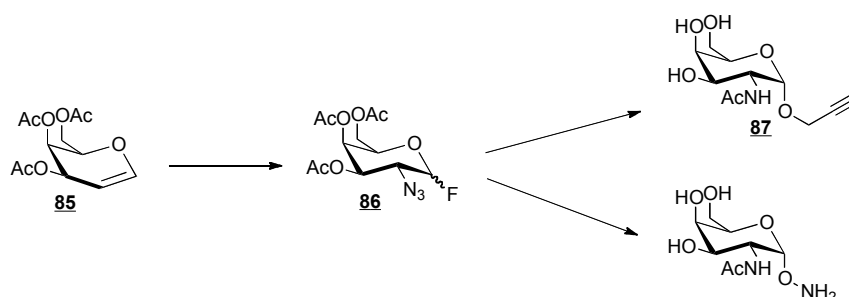


Schéma 18 : Intermédiaires clés de la stratégie développée au laboratoire pour préparer les dérivés de l'antigène Tn en série propargylée ou oxyaminée

Le dérivé *D*-galactal **85** est un composé commercial qui reste très cher, nous avons donc décidé de le synthétiser selon la procédure représentée dans le *schéma 19*.

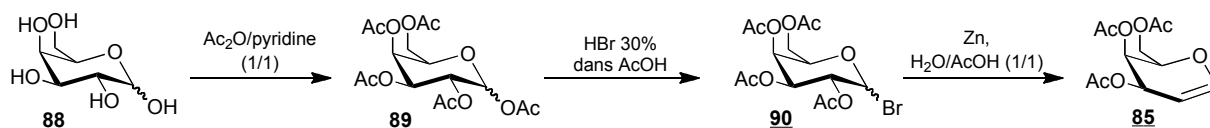


Schéma 19 : Synthèse de l'intermédiaire *D*-galactal **85**

Le galactose **88** est peracétylé dans un mélange Ac₂O/pyridine selon la méthode classique, puis le composé acétylé **89** est activé par HBr en solution dans 30% d'acide acétique. Le *D*-galactal **85** est finalement obtenu à partir du dérivé bromé **90** en présence de zinc dans un mélange eau / acide acétique à 0°C avec un rendement de 65% sur les 3 étapes.

Le dérivé fluoré **86** est obtenu en 3 étapes à partir du galactal **85** (Schéma 20). La première étape implique la réaction d'azidonitration décrite par Lemieux et Ratcliffe. Cette réaction se déroule en présence d'un excès de nitrate d'ammonium cérique (CAN) et d'azoture de sodium dans l'acétonitrile à -15°C. Cette étape permet d'obtenir le composé **91** portant un azoture en position 2-équatoriale. Ce groupement azoture dit « non participant » permettra de faciliter la formation de l'anomère alpha souhaité lors de la réaction de glycosylation grâce à l'effet anomère.

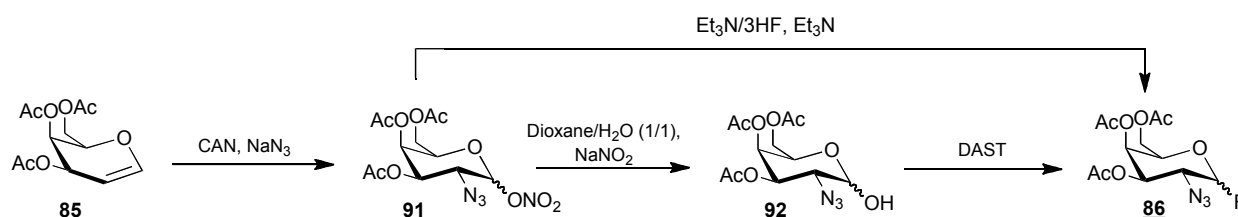


Schéma 20 : Synthèse du dérivé fluoré **86**

La position anomère du produit azidonitré est ensuite déprotégée dans un mélange dioxane/eau en présence de nitrite de sodium. Le composé obtenu est ensuite traité par du DAST pour former le dérivé fluoré **86** avec un rendement global de 60% (3 étapes). Afin d'optimiser cette synthèse, nous avons réalisé la fluoration directement sur le produit azidonitré **91** selon une procédure décrite par le groupe de Nishimura^[247] utilisant un complexe HF/Et₃N. On obtient ainsi 76% du composé fluoré **91** et 24% de produit d'hydrolyse **92** pour un rendement global légèrement supérieur à 63%. L'avantage de cette nouvelle voie de synthèse est qu'elle permet de s'affranchir de l'étape d'hydrolyse, même si le rendement est comparable au précédent. De plus, le produit d'hydrolyse **92** formé durant la réaction peut facilement être activé en présence de DAST pour conduire au produit **86** ce qui évite la perte de matériel.

- Paramètres de glycosylation par l'alcool propargylique

La synthèse du α -GalNAc en série propargyle n'a jamais été décrite à partir de l'intermédiaire fluoré **86** préparé précédemment.

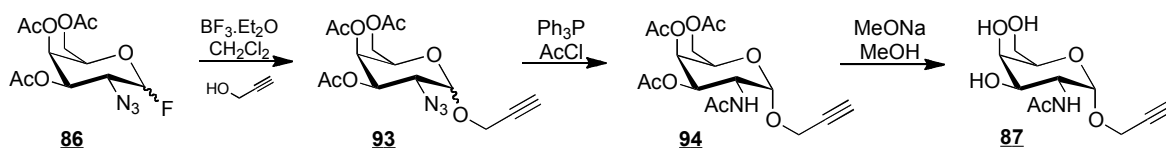


Schéma 21 : Stratégie de synthèse du α -GalNAc en série propargylée à partir du dérivé fluoré **86**

La première étape de cette synthèse est la glycosylation de l'intermédiaire fluoré **86** par l'alcool propargylique, en utilisant 4 équivalents d'alcool propargylique redistillé et 2,4 équivalents du promoteur $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ dans le CH_2Cl_2 anhydre (Schéma 21). Nous obtenons **93** avec un rendement de 90%, cependant cette réaction est peu stéréosélective puisqu'un mélange d'anomère α/β est formé (6 : 4 déterminé *via* la RMN du proton). A ce stade ces anomères ne peuvent malheureusement pas être séparés sur colonne de silice en raison de leur polarité trop proche.

L'antigène Tn natif étant de configuration α , nous avons étudié quels facteurs permettraient d'augmenter la proportion de ce stéréoisomère. Parmi les paramètres connus pour influencer la stéréosélectivité et le rendement de la glycosylation, le choix du (ou des) solvant(s) est particulièrement important (Schéma 22). Il est en effet connu que les solvants éthers ont un effet α directeur par leur habilité à venir se lier à l'oxocarbenium (carbocation) formé durant la réaction (Schéma 22), alors que l'acetonitrile favorise généralement la formation de l'anomère β .

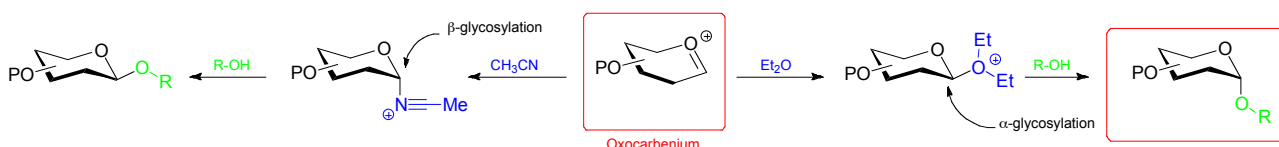


Schéma 22 : Effet du solvant sur la stéréosélectivité de la réaction de glycosylation

Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de ce paramètre pour réaliser la réaction de glycosylation du composé **86** avec l'alcool propargylique dans les conditions (promoteur, excès de réactif) décrites précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Solvant	Rendement (brut)	Ratio α / β
CH_2Cl_2	90%	6 : 4
Et_2O	Traces de produits	Non isolé
THF	Aucune réaction	Non isolé

CH ₂ Cl ₂ /Et ₂ O	55%	7 : 4
CH ₃ CN	77%	1 : 2

Tableau 4 : Influence du solvant sur la glycosylation

Ces expériences ont montré que la glycosylation ne fonctionne pas dans des solvants de type éther, même après 24h de réaction, en raison de problème de solubilité de l'intermédiaire fluoré dans l'Et₂O ou le THF. Nous avons donc effectué la réaction dans un mélange de solvant CH₂Cl₂/Et₂O (1/1). On observe dans ces conditions une légère augmentation de la proportion d'anomère α (7:4) cependant la réaction est beaucoup plus lente et le rendement est nettement plus faible que précédemment (55% au lieu de 90% dans le cas du CH₂Cl₂ pur). Enfin, comme attendu, la glycosylation réalisée dans l'acétonitrile favorise la formation de l'anomère β .

- *Etude de la réduction*

Nous avons décidé de réaliser la réaction suivante, en espérant pouvoir séparer le mélange d'anomère α/β à ce stade. Cette étape consiste à réduire sélectivement l'azoture en C-2, sans réduire l'alcyne du propargyl, puis à acétyler l'amine libérée pour obtenir le composé **94**. Pour ce faire, différentes conditions résumées dans le *Tableau 5* ont été utilisées. Les essais de réductions ont été réalisés à partir de zinc et de chlorure d'ammonium dans un mélange méthanol / eau^[248]. La formation de la fonction amino libre peut être observée par CCM en utilisant de la ninhydrine comme révélateur coloré. Une fois la réaction terminée et traitée, l'amine libre est acétylée par de l'anhydride acétique dans la pyridine. On observe en CCM deux produits correspondant aux anomères α/β qui semblent cette fois-ci isolables par chromatographie sur gel de silice. La purification permet en effet de séparer les deux anomères dans un système d'éluant méthanol/éther. On obtient un rendement modeste en anomère α isolé de 20% (2 étapes) qui s'explique par faible taux de conversion observé lors de l'étape de réduction.

Entrée	Réducteur	Nombre d'éq.	Conditions	Rendement α isolé
1	Zn	1,33	NH ₄ ⁺ Cl ⁻ puis Ac ₂ O	20%
2	Zn	1,33	One-pot	19%
3	CH ₃ COSH	4	One-pot	15%
4	PPh ₃	1,5	Voir <i>Tableau 6</i>	35%

Tableau 5 : Conditions utilisées pour réduire sélectivement l'azoture

Nous avons répété cette réaction dans des conditions « one-pot » où tous les réactifs sont ajoutés simultanément. Aucune amélioration significative ne semble être apportée et des sous-produits

apparaissent lorsque la réaction est réalisée à 50°C. Comme méthode alternative, nous avons décidé d'utiliser l'acide thioacétique selon un mode opératoire décrit^[249] par le groupe de Chu. Le CH₃COSH est mis en présence de l'azoture **93** sous courant d'argon pendant 5h. Cette réaction permet d'obtenir le produit **87** avec des rendements identiques à la méthode utilisant le zinc.

Pour améliorer ce rendement, nous avons testé l'utilisation de phosphine. Cette réaction permet de réduire efficacement et très sélectivement les azotures en présence de phosphine par la réaction de Staudinger qui se déroule selon le mécanisme donné dans la *Schéma 23*.

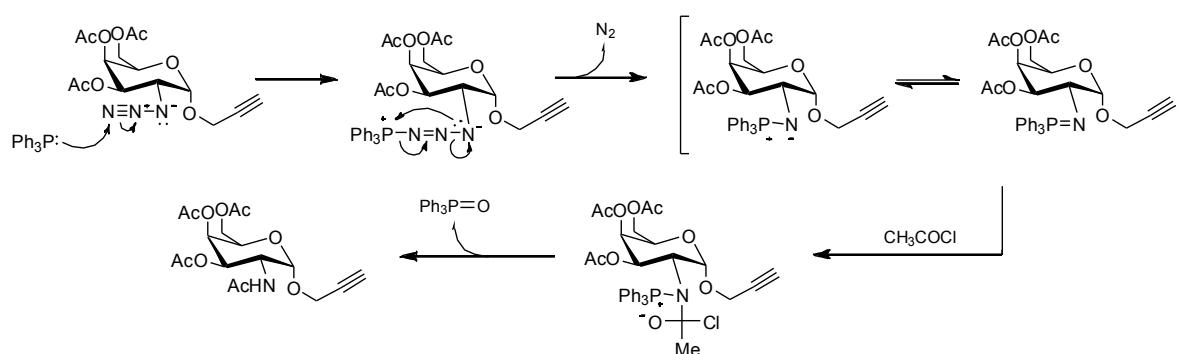


Schéma 23 : Mécanisme de réduction de l'azoture par la triméthylphosphine

La phosphine va d'abord réagir avec l'azoture pour former la phosphinimine. Cette étape est rapide et quantitative puisque l'on observe la disparition totale de l'azoture en CCM et un dégagement caractéristique d'azote pendant 30 min. Ensuite, l'azote de l'aza-ylide (en équilibre avec la phosphinimine) peut réagir avec un agent acétylant (Ac₂O ou AcCl) pour former un intermédiaire qui est rapidement hydrolysé pour former un groupement N-acétyle et de l'oxyde de triarylsphosphine^[125] (*Schéma 23*). Cette réaction d'acylation est l'étape limitante car même après 16h la totalité de la phosphinimine n'est pas consommée. Pour optimiser cette réaction, nous avons testé différentes conditions représentées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 6*).

Entrée	Nombre éq. PPh ₃	Agent acétylant	Conditions	Rendement α isolé
1	1,3	Ac ₂ O 1éq	Séquentiel	27%
2	1,3	AcCl 1éq	Séquentiel	30%
3	1,5	AcCl 5éq	One-pot	35%
4	1,5	AcCl 10éq	One-pot	35%

Tableau 6 : Conditions utilisées pour réduire sélectivement l'azoture à partir de triphénylphosphine

Différents agents acétylants comme l'anhydride acétique ou encore le chlorure d'acétyle^[250] ont été utilisés. Les rendements sont seulement légèrement supérieurs dans le cas de AcCl (entrée 1 et 2

Tableau 6). En se basant sur d'autres études,^[251] nous avons décidé de réaliser la réduction/acétylation en une seule étape, et dans le même temps d'augmenter les quantités d'AcCl et de PPh₃. Au bout de 16h dans les conditions décrites dans le *Tableau 6, entrée 3*), un rendement de 35% d' α isolé est obtenu. En revanche, aucun effet bénéfique n'est observé avec un plus large excès (10 équivalents) de AcCl (*entrée 4 Tableau 6*).

A travers ces différentes expériences nous avons étudié plusieurs conditions réactionnelles pour réduire sélectivement un azoture vis-à-vis d'un alcyne. Même si les rendements restent modestes, l'anomère α est désormais isolable à l'issue de cette étape.

Ce composé a pu être cristallisé dans un mélange CH₂Cl₂/pentane et sa structure RX déterminée par l'équipe de cristallographie du CH₂Cl₂ (*Figure 47*). Nous avons ainsi confirmé sa structure et la nature du lien glycosidique alpha comme l'indiquait la valeur de la constante de couplage mesurée en RMN ($J = 3,7$ Hz pour l'anomère α et $J = 8,4$ Hz pour le β).

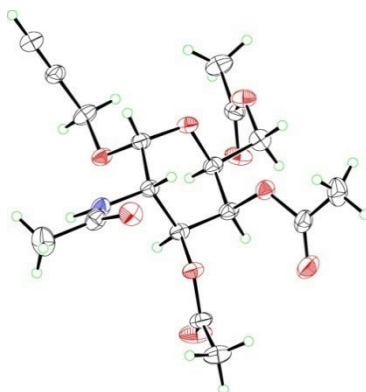


Figure 47 : Structure RX du composé 87

Pour finir, les groupements protecteurs acétyle en position 3, 4 et 6 sont éliminés par ajout de méthanolate de sodium dans le méthanol, selon la procédure de Zemplén.^[252] Cette méthodologie permet donc d'obtenir en trois étapes, à partir de l'intermédiaire fluoré 86, le α -GalNAc propargylé 87 avec un rendement global sur les 3 étapes de 35%. Ce rendement est modeste mais comparable à la procédure décrite par Fairbanks (*entrée 1 Tableau 3*). La réduction semble toutefois être l'étape limitante dans notre cas et ceux décrits dans le *tableau 3* et doit être optimisée pour améliorer les rendements de synthèse.

II.B. Synthèse de l'antigène TF en série propargylée

La synthèse de ce composé n'ayant pas été décrite dans la littérature, nous avons imaginé deux méthodologies pour la préparation du marqueur TF en série propargylée.

- *Stratégie A*

Pour cette première stratégie, nous avons souhaité utiliser l'antigène Tn précédent pour éviter de réaliser les étapes de propargylation et de réduction. Pour cela, le composé **87** précédent est protégé sur ses positions 4 et 6 par du benzaldéhyde diméthylacétal en présence de CSA. Après 5h à 50°C, la réaction est traitée puis purifiée sur colonne de silice, puis le composé est précipité dans un mélange CH₂Cl₂/pentane pour un obtenir le composé **97**, sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 64%.

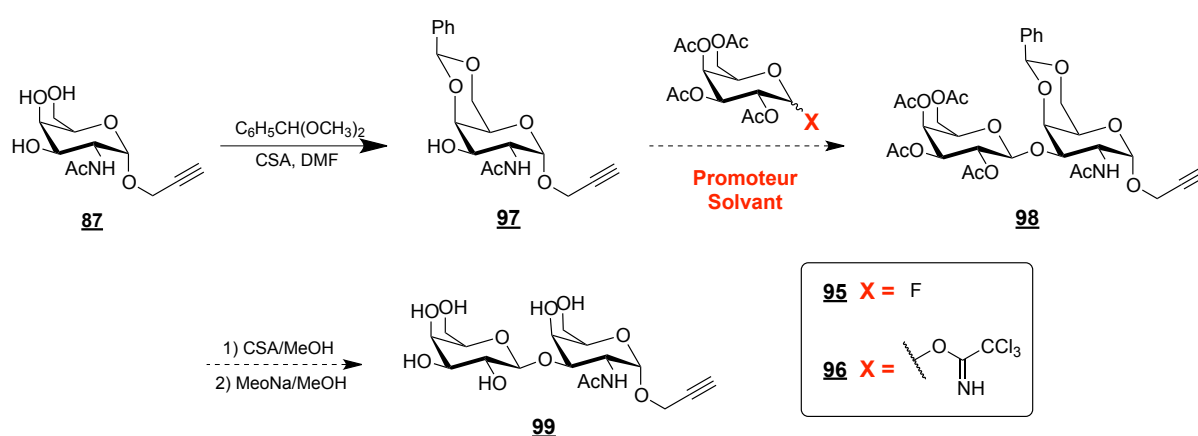


Schéma 24 : Synthèse de l'antigène TF en série propargyl voie A

Nous avons testé différentes conditions (promoteurs et sucres donneurs) pour réaliser l'étape de glycosylation avec le sucre accepteur **97**. En se basant sur des travaux antérieurs, nous avons d'abord utilisé le trichloroacétimidate **96** en présence de 0.5 équivalent de TMSOTf dans du dichlorométhane. La réaction a été effectuée pendant 1h à -20°C sous courant d'argon (entrée 1 *Tableau 7*). L'analyse du brut réactionnel par CCM indique la disparition complète de **97** et l'apparition d'impuretés non UV-visible, semblant signifier que le benzylidène a été éliminé. Après purification sur silice, on récupère des sous-produits non identifiés ne correspondant pas au dissaccharide attendu, de plus aucun produit ne semble contenir de groupement propargylique. Des résultats identiques ont été obtenus dans différents solvants, avec des quantités plus faibles et une vitesse d'addition plus lente du promoteur. Nous avons ensuite utilisé le BF₃.OEt₂ comme promoteur et le Gal-F **95** comme donneur. Une fois encore les résultats furent très décevants, quelle que soit la température, puisqu'aucun nouveau produit absorbant en UV n'a été observé en CCM (entrée 2 et 3 *Tableau 7*).

Entrée	Donneur	Promoteur	Nombre éq.	T °C	Solvant
1	Gal-TCA	TMSOTf	0,5	-20°C	CH ₂ Cl ₂
4	Gal-TCA	TMSOTf	0,1	-20°C	CH ₂ Cl ₂
5	Gal-TCA	TMSOTf	0,1	-20°C	CH ₃ CN
6	Gal-TCA	TMSOTf	0,1	-20°C	DMF
2	Gal-F	BF ₃ .OEt ₂	0,5	-20°C	CH ₂ Cl ₂
3	Gal-F	BF ₃ .OEt ₂	0,5	0°C	CH ₂ Cl ₂

Tableau 7 : Conditions utilisées lors de l'étape de glycosylation

- *Stratégie B*

Nous avons donc imaginé une seconde stratégie de synthèse similaire à celle utilisée pour la synthèse de l'antigène TF oxyaminé (*Schéma 25*) qui utilise ici encore l'intermédiaire clé est le disaccharide fluoré **102**. Cette stratégie a toutefois été optimisée pour éviter certaines étapes délicates.

Les groupes acétyles de l'intermédiaire fluoré **86** sont dans un premier temps déprotégés par action du méthanolate de sodium, puis les positions 4 et 6 sont protégées sélectivement par un groupement benzylidène pour conduire au composé **100** avec un excellent rendement de 93% obtenu sur 2 étapes.

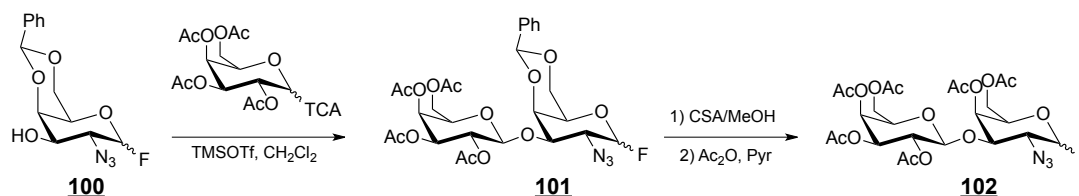


Schéma 25 : Préparation de l'intermédiaire fluoré **102**

Le disaccharide **101** est ensuite formé par réaction entre le sucre fluoré **100** et le sucre donneur portant un groupement trichloroacétimide, en utilisant du TMSOTf comme promoteur. Cette étape de glycosylation est chimiosélective car les sucres fluorés et imidates sont connus pour être activés par le TMSOTf. Cependant une activation sélective de l'imide peut être obtenue en réalisant la réaction à basse température (-20°C). Après purification sur colonne de silice, le disaccharide **101** est obtenu avec un rendement de 87%. Enfin, une étape de clivage du benzylidène suivie d'une réaction d'acétylation des hydroxydes libres permet d'obtenir le disaccharide fluoré **102** avec un rendement de 82%. Cette intermédiaire fluoré **102** va être cette fois glycosylé par l'alcool propargylique en présence de BF₃.OEt₂, dans des conditions similaires à celles décrites pour

l'antigène Tn. Après 2h de réaction, on obtient un mélange anomérique α/β séparable par chromatographie sur gel de silice. L'anomère α est isolé avec un rendement de 47% (Schéma 26).

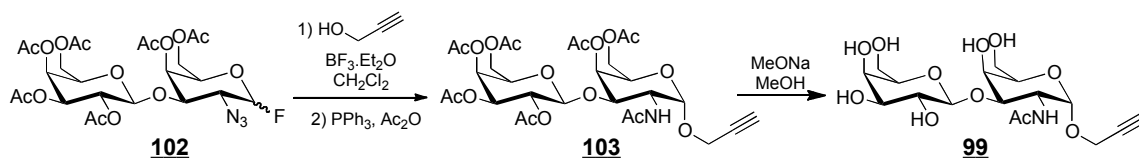


Schéma 26 : Synthèse de l'antigène TF en série propargylée selon la voie B

La réduction sélective de l'azoture puis l'acétylation de l'amine obtenue est réalisée par l'intermédiaire de la triphénylphosphine et de l'anhydride acétique respectivement selon la procédure décrite précédemment. Après 16h de réaction, le composé **103** est obtenu avec un rendement de 85%. Enfin, les groupes protecteurs acétyles sont éliminés suivant les conditions de Zemplén pour donner le TF en série propargyle **99** attendu avec un rendement global de 40% calculé sur trois étapes.

III. Préparation des plateformes complémentaires

Une fois ces motifs osidiques synthétisés, nous avons préparé les cyclodécapeptides portant les fonctions complémentaires. Des aldéhydes, des azotures, des alcènes ou des groupements chloroacétyle ont été introduits sur le cyclodécapeptide par l'intermédiaire des lysines situés de part et d'autre du plan moyen du cycle (voir *Introduction*). Pour cela deux stratégies sont couramment utilisées au laboratoire pour préparer ce type de plateforme fonctionnelle :

- soit les lysines sont post-fonctionnalisées une fois le décapeptide synthétisé sur support solide, clivé de la résine et cyclisé.

- soit des lysines pré-fonctionnalisées (appelées « building block ») sont intégrées lors de la synthèse sur support solide (SPPS) du décapeptide linéaire. Ceci permettra un gain de temps significatif et un nombre de purification réduit.

1. Préparation de plateforme multivalente « aldéhyde »

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la ligation oxime est une stratégie couramment utilisée au laboratoire pour diverses applications.^{[253] [254]} Toutefois l'utilisation d'oxime est souvent sujette à controverse, principalement en raison de son instabilité dans l'eau. Cependant il a été montré au laboratoire^[255] et dans la littérature^[169] que les oximes glycoxyliques issues de la condensation entre un aldéhyde glycoxylique (ou α -céto-aldéhyde) et une oxyamine sont plus stables que les oximes aliphatiques grâce à la présence du carbonyle en α . C'est principalement

pour ces raisons de stabilité que nous avons décidé d'utiliser des aldéhydes glyoxyliques et non aliphatiques pour réaliser le type de construction envisagée. Cette méthodologie nécessite d'introduire des résidus sérines qui pourront facilement être transformés en aldéhyde glyoxylique par coupure oxydante. L'avantage est que ces précurseurs de groupement aldéhyde peuvent être aisément préparés par l'intermédiaire de building block (Schéma 27).

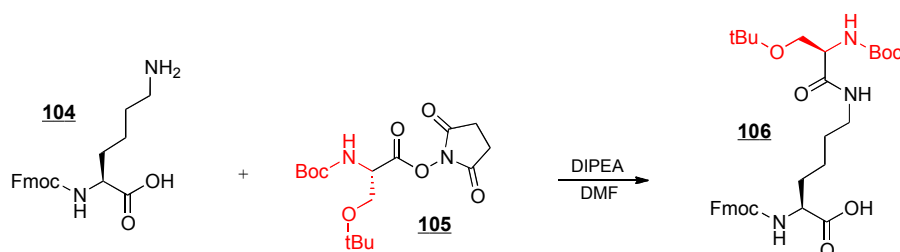


Schéma 27 : Synthèse du building block *Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH* **106**

Pour cela un dérivé commercial de sérine (Boc-Ser(tBu)) est introduit sur l'amine ϵ de la *Fmoc-Lys-OH* **104** en utilisant l'ester activé **105** en présence de DIPEA (pH 8) dans le DMF. Le building block *Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH* **106** obtenu est purifié sur colonne de silice et directement incorporé par SPPS. L'élongation du peptide linéaire peut être réalisée manuellement ou par voie automatisée en stratégie Fmoc/tBu sur une résine acido-labile Gly-Sasrin®. L'avantage avec cette résine est que le premier acide aminé est déjà introduit sur le support. La synthèse d'un peptide cyclique débute généralement par un résidu achiral comme la glycine afin d'éviter les phénomènes d'épimérisation qui peuvent apparaître lors de l'étape de cyclisation. Les cycles de déprotection des amines *N*-terminales sont effectués avec une solution de pipéridine à 20%. Les couplages peptidiques sont réalisés avec le PyBOP comme agent de couplage en présence de diisopropylethylamine (DIPEA) comme base. En fin de synthèse le peptide linéaire **107** est obtenu (Schéma 28).

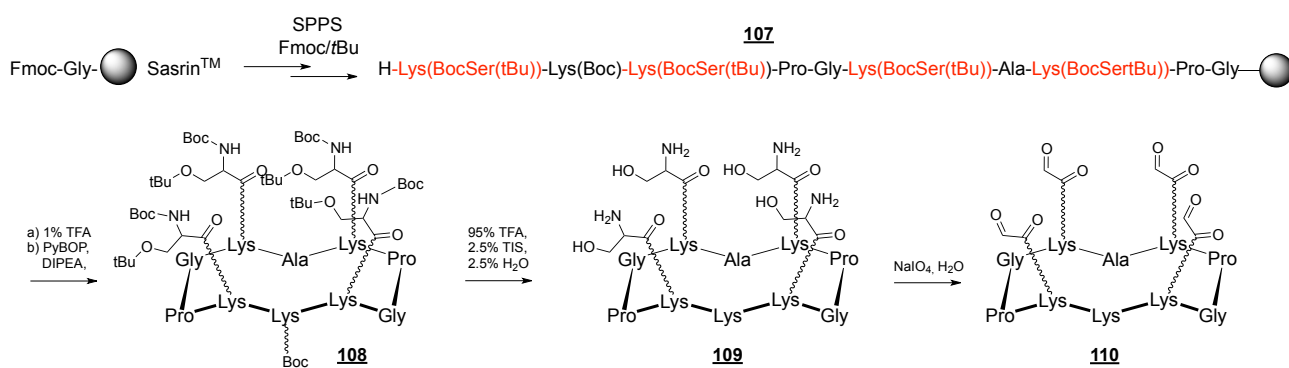


Schéma 28 : Plateforme multivalente portant des points d'ancrages aldéhydes

Ensuite, le peptide linéaire protégé est libéré du support dans des conditions acides douces (1% TFA) compatibles avec les groupements Boc et tBu. La cyclisation du décapeptide est réalisée en présence d'agent de couplage (PyBOP) en milieu très dilué (10^{-5}) pour favoriser la réaction intramoléculaire. Pour finir, les groupes protecteurs acido-labiles Boc et tBu sont clivés par un mélange TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) pour obtenir le cyclodécapeptide **109** portant quatre sérines sur la face supérieure. Enfin une coupure oxydante par action du périodate de sodium permet de transformer les résidus sérines en aldéhyde. Cette réaction est réalisée dans l'eau à température ambiante en utilisant 10 équivalents de NaIO₄ par sérine. Après 30 minutes de réaction, le brut réactionnel est purifié par HPLC semi-préparative pour éliminer l'excès de périodate de sodium et le formaldéhyde libéré lors de la réaction. Le châssis moléculaire **110** est finalement obtenu après lyophilisation avec un rendement de 80% en moyenne.

III.A. Préparation de plateforme multivalente « azoture »

La deuxième méthode de ligation chimiosélective que nous avons utilisé est la cycloaddition de Huisgen qui implique un azoture et un alcyne. La parfaite compatibilité des azotures avec la synthèse de peptide sur support solide va nous permettre d'utiliser un building block portant cette fonction. Une fonction azoture peut être facilement incorporée sur un acide aminé par substitution nucléophile d'un dérivé halogéné par un azoture^[256], greffage d'un linker ou encore transfert d'un groupement diazo. Cette dernière stratégie est particulièrement intéressante car elle permet de transformer de manière sélective les amines primaires de lysine en azoture avec des rendements élevés, sans affecter la stéréochimie de la molécule. Généralement, ce diazo-transfert est effectué en utilisant de l'azoture de triflate sous catalyse par un métal de transition bivalent.^{[257] [258]} Cependant il comporte de nombreux désavantages liés notamment à son instabilité et sa faible solubilité en milieux aqueux. En 2007, le groupe de Goddart-Borger^[259] a mis au point un réactif alternatif plus stable et plus facile à préparer, l'imidazole-1-sulfonyle. L'utilisation de ce réactif nous a permis de synthétiser en une seule étape le composé **111** à partir de la Fmoc-Lys-OH (*Schéma 29*).

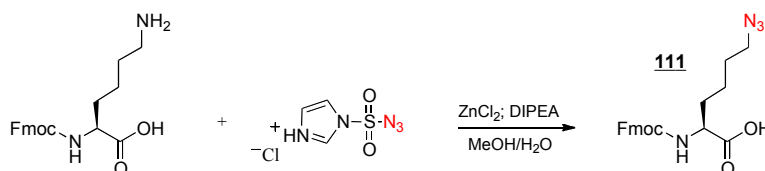


Schéma 29 : Synthèse du building block *Fmoc-Lys(N₃)-OH* **111**

Cette réaction est effectuée en présence d'une quantité catalytique de chlorure de zinc et de DIPEA. Une fois la réaction complète, le building block *Fmoc-Lys(N₃)-OH* (ou Nle azidonorleucine) **111** est

isolé avec un excellent rendement (91%). Ce composé est ensuite utilisé lors de la synthèse du peptide linéaire **112** en SPPS comme décrit précédemment. Après clivage de la résine et cyclisation, le RAFT **113** portant quatre fonctions azotures (*Schéma 30*) est obtenu après purification par HPLC en phase inverse.

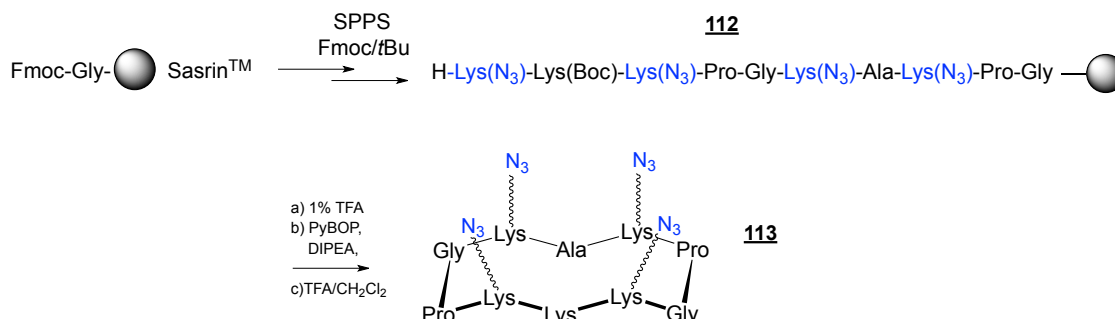


Schéma 30 : Plateforme multivalente portant des points d'ancrages azotures

III.B. Préparation de plateforme multivalente « Aloc »

L'obtention d'un châssis fonctionnalisé par des doubles liaisons est extrêmement simple puisqu'il suffit d'utiliser des groupes protecteurs Aloc pour les chaînes latérales des lysines. Un décapeptide linéaire portant quatre lysines protégées par des groupements Aloc a donc été synthétisé par SPPS (*Schéma 31*).

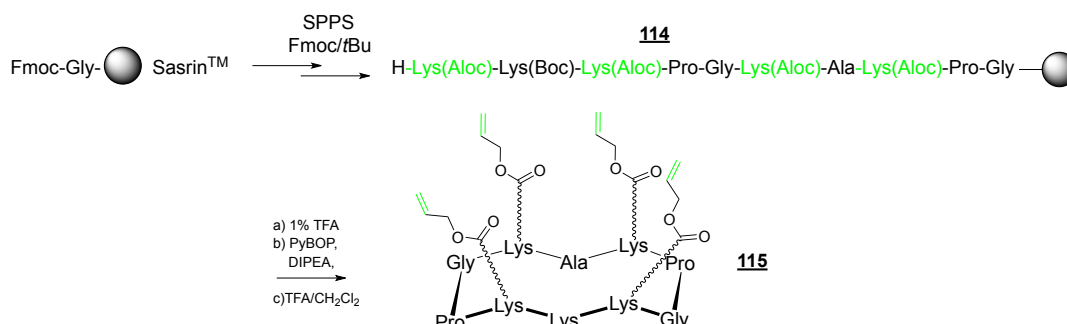


Schéma 31 : Plateforme multivalente portant des points d'ancrages Aloc

Ce peptide linéaire est clivé de la résine puis cyclisé, pour obtenir après purification le cyclodecapeptide **115** décoré avec quatre alcènes qui pourra être engagé tel quel dans une réaction photo-induite de type thiol-ène.

III.C. Préparation de plateforme multivalente « chloro-acétyle »

La dernière méthode de ligation chimiosélective que nous avons étudié est la ligation TCC. Contrairement aux autres châssis que nous avons préparés précédemment, nous ne pouvons pas

utiliser de building block pour préparer une plateforme multivalente portant quatre chloro-acétyles car ces groupements ne sont pas compatibles avec la SPPS. Nous devons donc dans un premier temps préparer un décapeptide linéaire portant quatre lysines protégées par des Boc (*Schéma 32*).

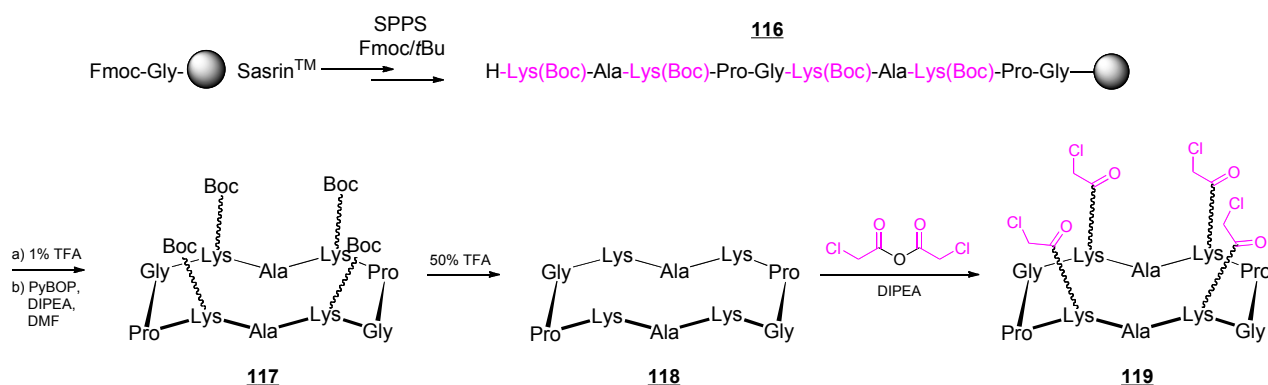


Schéma 32 : Plateforme multivalente portant des points d'ancrages chloro-acétyle

Après clivage de la résine, cyclisation du peptide et coupure des groupes protecteur Boc, le RAFT **118** portant 4 lysines sur sa face supérieure est obtenu. Ensuite les groupements chloro-acétyles sont introduits sur le châssis en utilisant de l'anhydride chloroacétique (2 équivalents) en présence de DIPEA (pH 8) dans du DMF. Après purification par HPLC semi-préparative, le RAFT **119** est obtenu avec une excellente pureté et un rendement de 81%.

IV. Stratégie d'assemblage chimiosélective d'homoglycoclusters tétravalents

La conjugaison de ces différents partenaires fonctionnalisés s'effectue à l'aide des méthodes de ligation chimiosélectives présentées précédemment.

1. Ligation oxime

Pour réaliser la ligation oxime, le RAFT **120** est dissous à une concentration de 10^{-2} M dans de l'eau contenant 0,1% de TFA (*Schéma 33*).

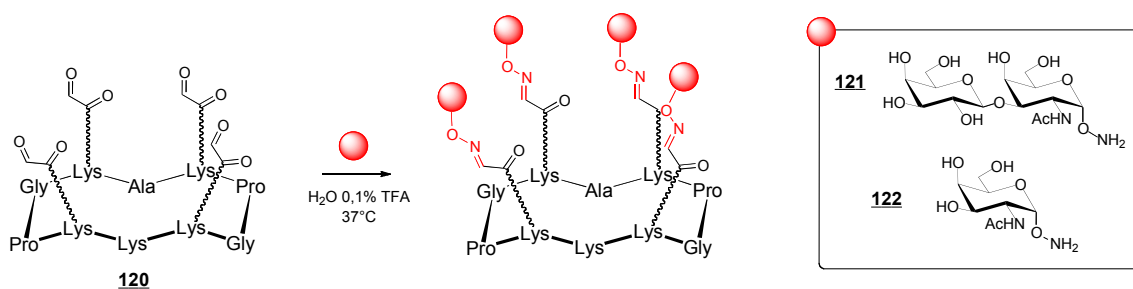


Schéma 33 : Stratégie d'assemblage par OL

Les antigènes osidiques Tn ou TF (2 équivalents) en série oxyamine sont ajoutés, puis la réaction est laissée à 37°C. Après 1h, on observe en HPLC analytique la disparition complète du signal correspondant au cyclodécapeptide **120** et l'apparition d'un pic fin correspondant au composé tétravalent. Ce pic possède un temps de rétention proche et présente une absorption à 254 nm caractéristique des liens éthers d'oximes. Le brut réactionnel est alors directement purifié par HPLC semi-préparative pour éliminer l'excès d'oxyamine. Finalement, les homoclusters portant quatre α -Tn **122** ou α -TF **121** sont obtenus avec des rendements de 87% et 81% respectivement.

IV.A. Ligation CuAAC

La cycloaddition CuAAC est beaucoup plus délicate à réaliser car son efficacité est très dépendante des conditions expérimentales. En effet, le choix du solvant, la source de cuivre (Cu(0), Cu(I) ou Cu(II)/ascorbate de sodium), l'utilisation de microondes et/ou chélateur de cuivre sont autant de paramètres qui sont susceptibles d'influencer la cinétique de la réaction, le rendement de couplage et la présence éventuelle de sous-produits. Nous avons d'abord étudié la réaction entre le RAFT **113** et le sucre propargylé en présence de Cu(0) (0,1 équivalent par azoture) dans un mélange tBuOH/Tampon phosphate pH 7,4 (1:1) (Schéma 34). La réaction est suivie par HPLC analytique et laissé sous agitation à température ambiante. Après 3h, on observe bien la formation du produit **124** attendu, cependant des sous-produits correspondant vraisemblablement à l'oxydation des triazoles par l'oxygène singulet généré par le cuivre sont également obtenus.

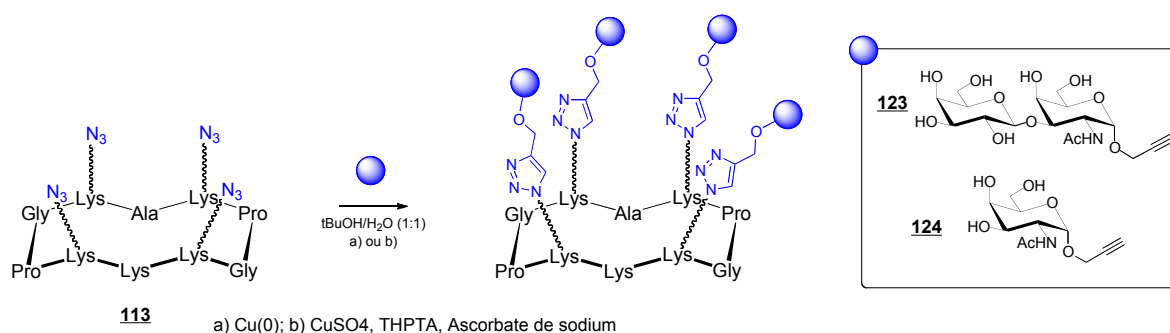


Schéma 34 : Stratégie d'assemblage par CuAAC

En se basant sur des travaux publiés en 2009^[208], nous avons montré que ce problème n'est pas observé lorsque la réaction est effectuée avec du CuSO₄ (1 équivalent par azoture), en présence d'un chélateur du cuivre de type THPTA (5 équivalents par azoture) et d'ascorbate de sodium (7 équivalents par azoture) pour réduire *in situ* le Cu(II) en Cu(I). Dans ces conditions, la réaction entre **113** et le sucre propargylé se déroule également en 3h et l'analyse HPLC montre un mélange réactionnel propre et l'apparition d'un pic fin et unique. Après la réaction, la résine chelex[®] est

ajoutée pour complexer le cuivre présent en solution, puis le composé est purifié par HPLC semi-préparative pour conduire aux homoclusters tétravalents **124** et **123** avec des rendements de 77% et 73% respectivement (*Schéma 34*). Ces produits ont été caractérisés sans difficulté par spectrométrie de masse.

IV.B. Ligation TEC

La réaction TEC nécessite d'irradier le décapeptide à une longueur d'onde de 365 nm et d'utiliser une verrerie de faible épaisseur pour permettre le passage du faisceau lumineux. Dans notre cas, cette réaction a été réalisée dans du DMF entre le peptide **125** et le sucre thiol en solution dans l'eau (2 équivalents par alcène), en présence de DPAP (2,2-diméthoxy-2-phenyl-acétophénone ; 0,2 équivalent par alcène) comme photo-initiateur (*Schéma 35*).

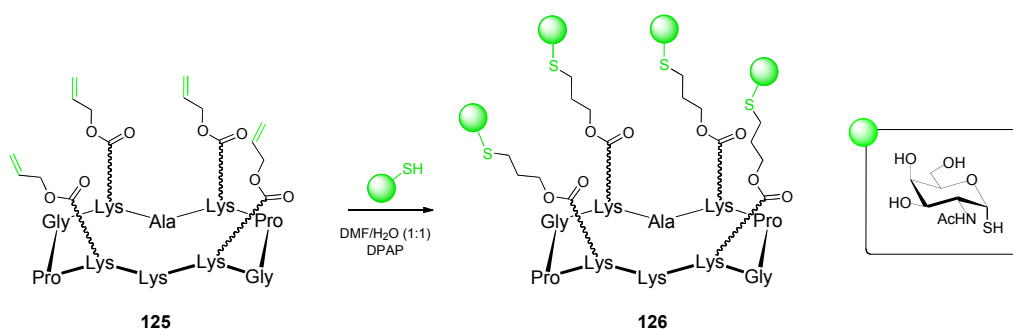


Schéma 35 : Stratégie d'assemblage par ligation TEC

La réaction est laissée sous agitation et sous irradiation à 365 nm entre 30 min et 1h (suivi par HPLC analytique) puis purifiée par HPLC semi-préparative. En suivant cette procédure l'homocluster **126** possédant quatre antigènes Tn est obtenu avec un rendement de 71%.

IV.C. Ligation TCC

La dernière stratégie d'assemblage que nous avons exploitée est la ligation TCC, en se basant sur une procédure décrite par le groupe de J.-L. Reymond pour la synthèse de dendrimères comme modèles enzymatiques^[260]. Pour réaliser cette réaction, le cyclodécapeptide **119** portant quatre fonctions chloro-acétyle est dissous dans du DMF, puis le sucre thiol (2 équivalents par site) en solution dans l'eau est ajouté au mélange précédent. Les deux solutions sont au préalable dégazées avec de l'argon pour éviter la formation de dimères correspondants à l'oxydation des sucres en pont disulfure (*Schéma 36*).

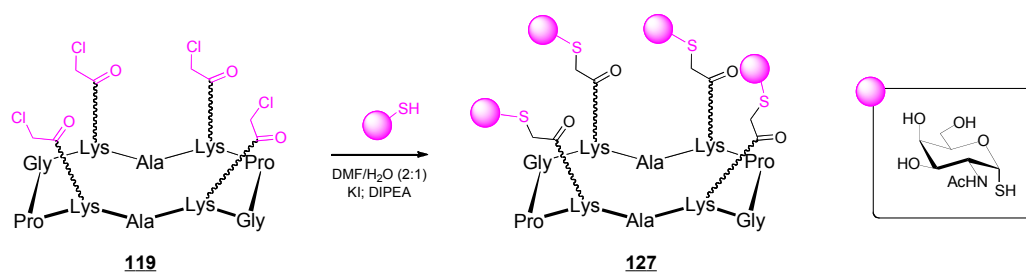


Schéma 36 : Stratégie d'assemblage par ligation TCC

De l'iodure de potassium (20 équivalents par site) et de la DIPEA (55 équivalents par site) sont ensuite ajoutés au mélange précédent puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. Après 1h, l'HPLC analytique indique que le couplage est terminé, l'homocluster tétra-valent **127** décoré par quatre antigènes Tn est alors obtenu avec un rendement de 81% après purification sur phase inverse.

V. Construction des candidats vaccins tétra-valents

Pour étudier l'influence du lien chimique (oxime, triazole ou thioéther) TACA/châssis sur la réponse par les lymphocytes B, nous avons accroché un peptide immunostimulant CD4⁺ sur ces différents composés. Pour cela, nous avons choisi : *i*) un fragment peptidique issu du Polio Virus 1 de séquence KLFVWKITYKDT ; *ii*) le peptide artificiel PADRE (Pan DR Epitope) de séquence (dA)K(Cha)VAAWTLKAA(dA)(Ahx) connu pour être un épitope T CD4⁺ universel très efficace. Ceci nous permettra de déterminer quel épitope CD4⁺ est le plus efficace. Ces peptides sont synthétisés sur support solide sur de la résine 2-chlorotrityle, puis ils sont clivés de la résine et purifiés par HPLC. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'un fragment peptidique peut être accroché facilement sur la face inférieure du RAFT par formation de pont disulfure. Pour cela, une cystéine est introduite sur l'extrémité C-terminale des peptides PV1 et PADRE. Ainsi les RAFT portant l'antigène Tn **122**, **124** et **126** sont fonctionnalisés sur leur domaine inférieur par la cystéine protégée et activée par un groupement 3-nitro-2-pyridinesulfonyl (NPys) par l'intermédiaire de l'ester activé Boc-Cys(NPys)-OSu **128** (Schéma 37).

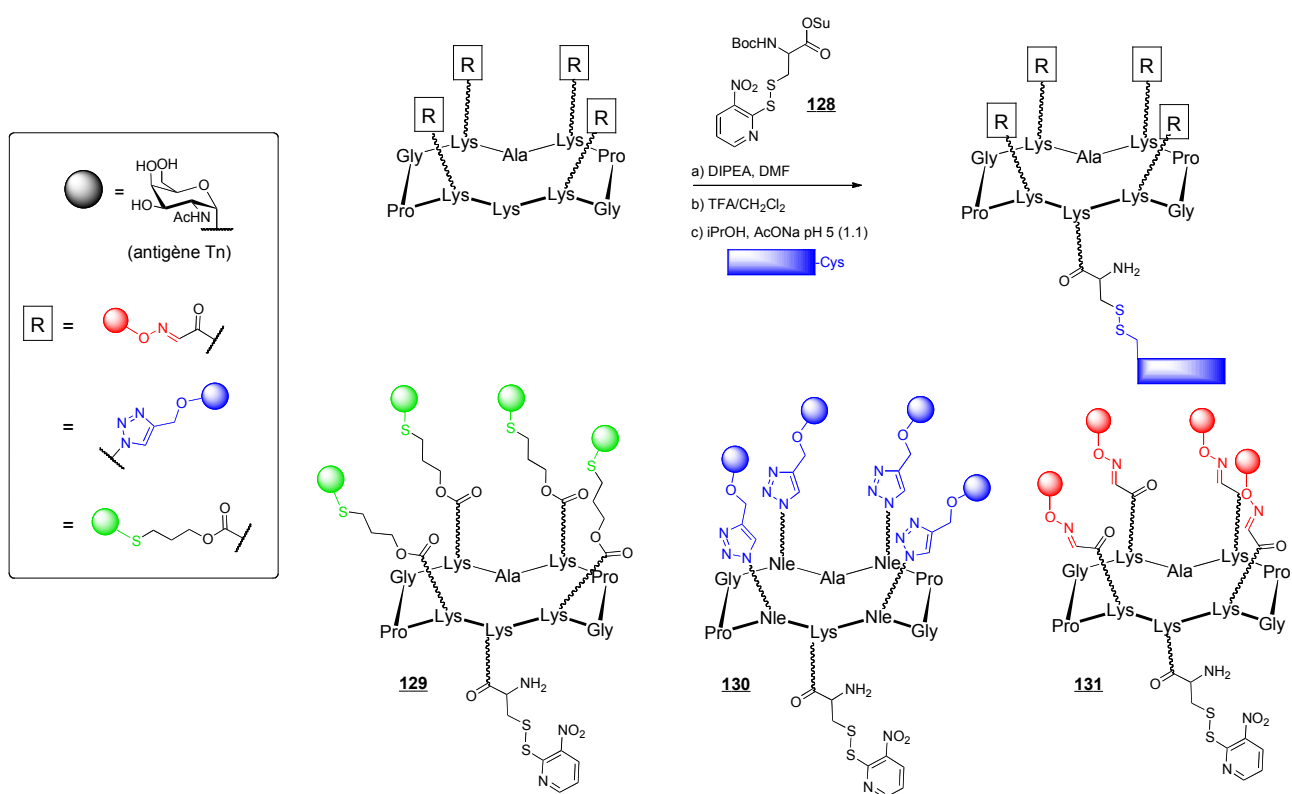


Schéma 37 : Synthèse des candidats vaccins tétravalents

La réaction est réalisée dans une solution de DMF légèrement basique (pH ajusté à 8 à l'aide de DIPEA) pendant 1h30 en présence de deux équivalents d'ester activé **128**. Après précipitation dans l'éther, le groupement Boc est supprimé et le peptide purifié par HPLC semi-préparative. Ensuite le couplage du châssis peut être réalisé avec les peptides PV1 ou PADRE par formation de pont disulfure (*Schéma 37*). Pour effectuer cette étape, les homoclusters **129**, **130** et **131** sont d'abord dissous dans un mélange DMF/Tampon acétate pH 5, puis la solution est dégazée sous pression réduite. Ensuite le peptide est ajouté au mélange précédent et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante sous atmosphère d'argon. Après 30 minutes, la solution devient jaune en raison de la libération de l'espèce nitro-pyridine signifiant que la réaction s'est bien produite. Les composés sont directement purifiés par HPLC pour obtenir les trois candidats vaccins **132**, **133** et **134** portant le peptide PV1 et trois autres **135**, **136** et **137** portant le peptide PADRE. Ces six molécules diffèrent soit par le lien qui relie l'antigène tumoral à la plateforme soit par le peptide immunostimulant accroché sur la face inférieure de la molécule (*Schéma 38*). Chaque composé a été caractérisé par ESI-MS et leur pureté confirmée par HPLC.

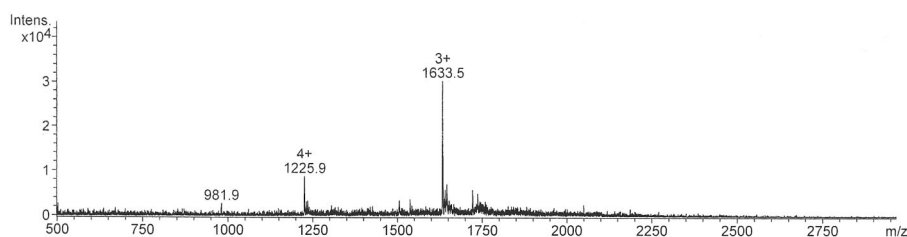


Figure 48 : Spectre ESI-MS du composé **133**

VI. Construction de vaccin tétravalent utilisant un mime de TACA

Comme nous l'avons évoqué en introduction, l'utilisation de mimes de TACA permet à la fois d'améliorer les propriétés immunologiques et la stabilité *in vivo*. L'équipe du Prof. C. Nativi (Université de Florence, Italie) a développé en 2009 une stratégie basée sur des réactions de cycloaddition hétéro-Diels-Alder qui permet d'obtenir des mimes énantiopures bicycliques d'antigènes de la famille des mucines, dont le Tn.^[52] Ce composé est un dérivé α -O-galactosyl dont la conformation 4C_1 du cycle est identique à celle de l'antigène natif. Il contient également trois fonctions hydroxyles et une fonction carboxylique qui peut être utilisée comme site de conjugaison (composé **138**, Schéma 39). Dans le cadre d'une collaboration avec son équipe, nous sommes allés synthétiser ce mime de Tn à Florence puis nous l'avons conjugué à notre cyclopeptide pour obtenir des structures analogues aux vaccins décrits en introduction. Ce type de structure est le premier exemple de vaccin entièrement synthétique composé de mimes d'antigène osidique.

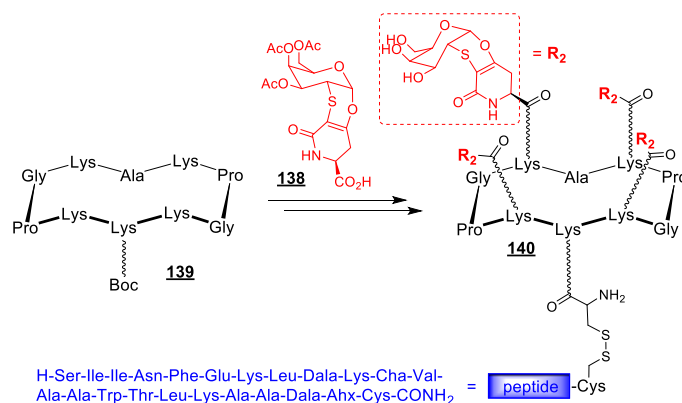


Schéma 39 : Stratégie utilisée pour préparer le composé **140** portant le mime de l'antigène Tn **138**

Le mime a été conjugué au cyclopeptide **139** en utilisant les conditions d'amidation classiques (PyBOP, DIPEA, DMF) puis le conjugué résultant a été déprotégé par traitement avec une solution de TFA puis de méthanolate de sodium. Le peptide OVA-PADRE a ensuite été accroché sur ce composé par formation de pont disulfure en suivant le protocole décrit précédemment. Le profil HPLC analytique obtenu pendant le suivi de la réaction montre clairement l'apparition d'un nouveau produit à 9.3 minutes et la présence de quelques impuretés vers 5 minutes (Figure 49).

Après purification par HPLC semi-préparative, le candidat vaccin **140** a été obtenu avec un rendement de 22% et caractérisé par ESI-MS (*Figure 49*).

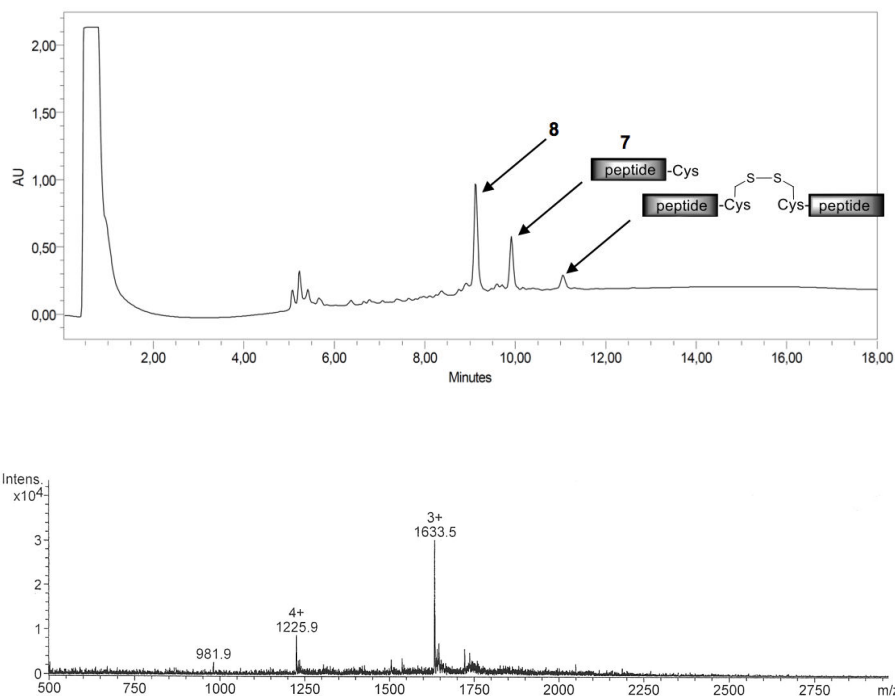


Figure 49 : a) Suivi de la réaction de couplage du peptide OVA-PADRE par HPLC b) Spectre ESI-MS du composé **140**

L'étude immunologique^[261] complète a été réalisée en collaboration avec le groupe de L. BenMohamed sur des souris B10.D1 immunisées par injection sous-cutanée en présence de CpG₁₈₂₆ comme adjuvant. Nous avons tout d'abord observé en ELISA la production de fortes quantités d'anticorps, en particulier des IgG, ainsi qu'un effet mémoire. Des études en cytométrie de flux ont mis en évidence que ces anticorps sont capables de reconnaître des cellules NT2, TA3HA et MCF7 qui expriment l'antigène Tn. Enfin, l'efficacité immunothérapeutique de ce composé a été démontrée avec des souris portant des tumeurs NT2 implantées en sous-cutané puisque près de 90% sont encore en vie après 60 jours. De plus le diamètre tumoral n'a pas évolué durant cette période (*Figure 50*). Même si les mécanismes immunitaires restent à étudier, des expériences complémentaires ont permis de déterminer que la réponse observée est essentiellement due aux lymphocytes B.

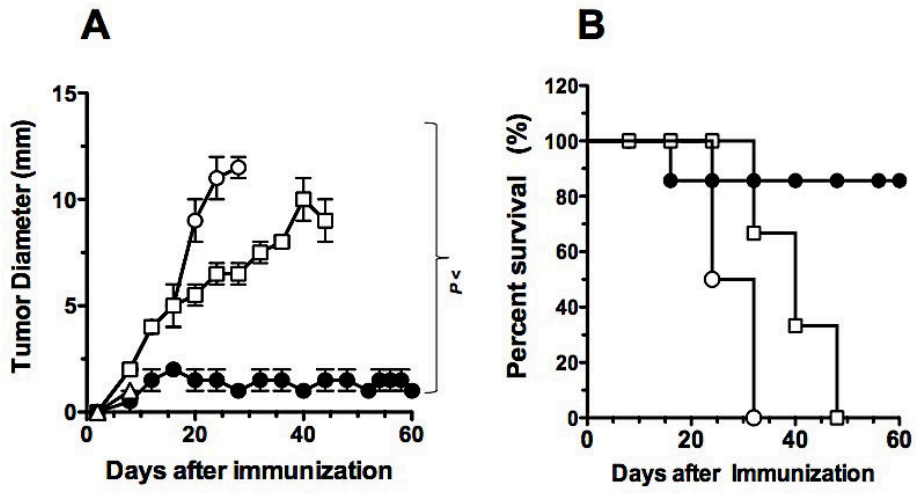
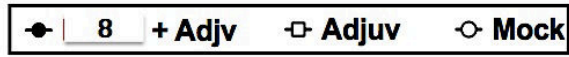


Figure 50 : Résultats des tests immunologiques

Chapitre III Synthèse d'homoglycoclusters de haut poids moléculaire

Comme nous l'avons vu en *Introduction*, le nombre et la densité de marqueur osidique présenté par un vaccin antitumoral influence fortement l'efficacité de la réponse immunitaire induite. Cet aspect est important car il permet de favoriser la délivrance du vaccin dans les lymphocytes B et ainsi exacerber la réponse immunitaire induite. En effet, le processus immunitaire implique une étape de reconnaissance du vaccin avec des protéines membranaires présentes sur ces cellules. Ces protéines étant généralement multimériques, une présentation des antigènes osidiques en cluster et dans une architecture adéquate devrait permettre d'améliorer les propriétés immunologiques du vaccin grâce à des interactions multivalentes. Ce type d'interaction moléculaire, aussi appelé « *glycoside cluster effect* »,^{[262] [263]} joue en effet un rôle clé dans la plupart des processus biologiques tels que la communication cellulaire, les infections par des agents pathogènes ou la migration des métastases. De nombreuses études ont permis de mieux comprendre ces mécanismes complexes.^{[264] [265] [266]}^[267] Sans rentrer dans les détails, on parle d'effet de multivalence lorsque l'affinité d'un ligand portant x unités sucres est fortement supérieure à x fois celle du ligand monovalent de référence. Cet effet peut être expliqué par plusieurs mécanismes dont ceux illustrés dans la *Figure 51*.

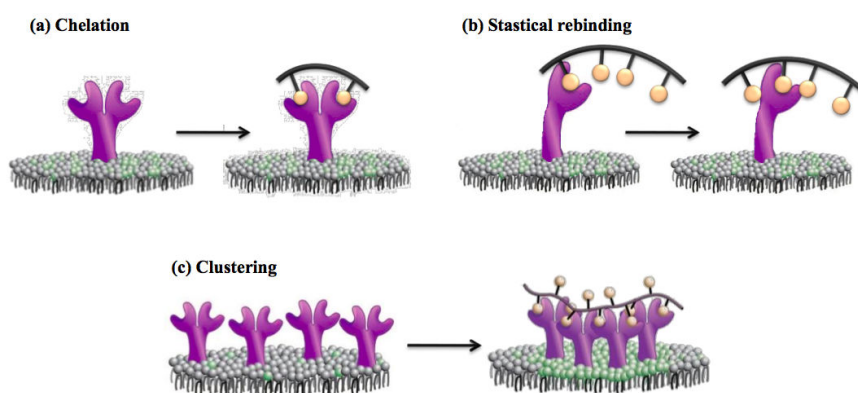


Figure 51 : Principaux mécanismes impliqués dans la reconnaissance multivalente

Le premier mode d'interaction est l'effet chélate (*Figure 51a*). Il est caractérisé par l'interaction simultanée entre un ligand multivalent et un récepteur possédant plusieurs sites de liaisons qui conduit généralement à un fort gain d'affinité. Le deuxième mode d'interaction est l'effet statistique (ou « *bind and jump* »).^[268] Cet effet plus complexe fait intervenir différentes unités qui peuvent se lier sur la même et/ou une autre protéine par le jeu d'associations/dissociations successives (*Figure 51b*). Le gain d'affinité est généralement plus faible que dans le cas précédent. Enfin, le dernier mode d'interaction est l'effet de clustering (*Figure 51c*). Ce mode d'interaction met en jeu un ligand multivalent interagissant avec de multiples récepteurs membranaires. Dans ce cas, la liaison

d'un premier ligand induit un rapprochement des récepteurs (« clustering ») sur la membrane cellulaire favorisant ainsi l'interaction de ligands supplémentaires. C'est ce dernier mécanisme qui semble impliqué dans les interactions vaccin/lymphocyte B.^[266]

Dans le cadre de notre travail, **notre second objectif** a été de développer des méthodologies de synthèses permettant d'augmenter le degré de multivalence de nos vaccins en espérant améliorer leur propriété de reconnaissance par les lymphocytes B.

A. Assemblage des homoglycoclusters hexadécavalents

1. Stratégies de synthèse de glycodendrimères

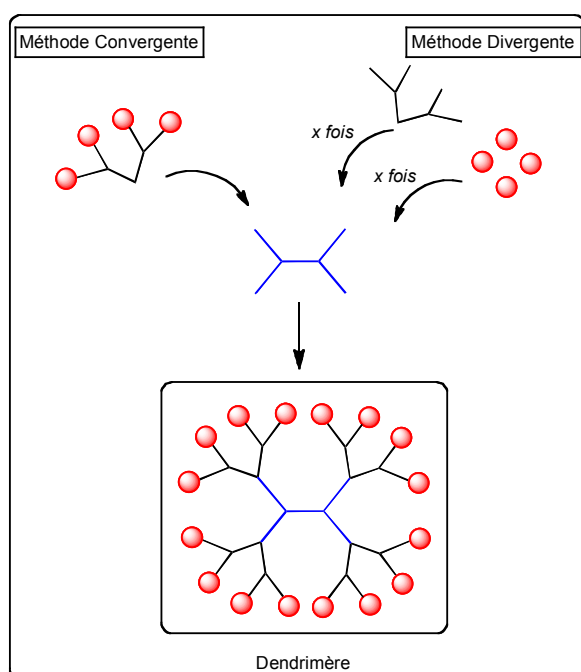


Schéma 40 : Méthodes de synthèse d'un dendrimère

Il existe deux grandes stratégies pour synthétiser des homoglycoclusters de haute valence (ou glycodendrimères). La stratégie *divergente* consiste en l'extension du dendrimère par couches successives à partir d'un cœur multifonctionnel pour finir par le couplage des unités osidiques (*Schéma 40*). C'est une méthode relativement longue et fastidieuse car les différents éléments sont introduits étape par étape pour créer une molécule de plus en plus « encombrée », ce qui peut conduire à la formation de sous-produits partiellement fonctionnalisés et difficilement séparables. Pour

éviter ces problèmes, les travaux de Fréchet et Hawker^[269] décrivent une stratégie *convergente* qui

permet de préparer au préalable des dendrons glycosylés qui sont ensuite introduits en une seule étape sur un cœur polyfonctionnel (*Schéma 40*). Ceci permet de limiter le nombre d'étapes de synthèse et les sous-produits éventuellement formés sont plus faciles à purifier dans ce cas.

I.A. Travaux du laboratoire

Nous avons démontré qu'une méthode entièrement basée sur la ligation oxime permet d'augmenter le nombre de point d'ancrage pour les sucres sur le cyclopeptide RAFT. Pour cela, nous avons

observé dans le cadre de la thèse d'Isabelle Bossu qu'une approche *convergente* est incompatible avec cette stratégie car des réactions de trans-oximation se produisent.^[254] En revanche, une méthode itérative et *divergente* incluant deux cycles d'oxydation et d'oximation successifs nous a permis de résoudre ce problème. En effet, le cœur cyclopeptidique a été fonctionnalisé avec plusieurs copies d'un second cyclopeptide ou d'une structure polylysine (*Schéma 41*) pour obtenir des plateformes de rigidité et d'architecture variable. Ces structures notées RR (dans le cas de structure à cœur RAFT et avec un squelette RAFT) et RD (cœur RAFT et squelette dendrimère) dans la suite de ce manuscrit, ont finalement été conjuguées avec des sucres par ligation oxime pour donner des glycodendrimères hexadécavalents avec de bons rendements et une excellente monodispersité même si leur caractérisation reste difficile.

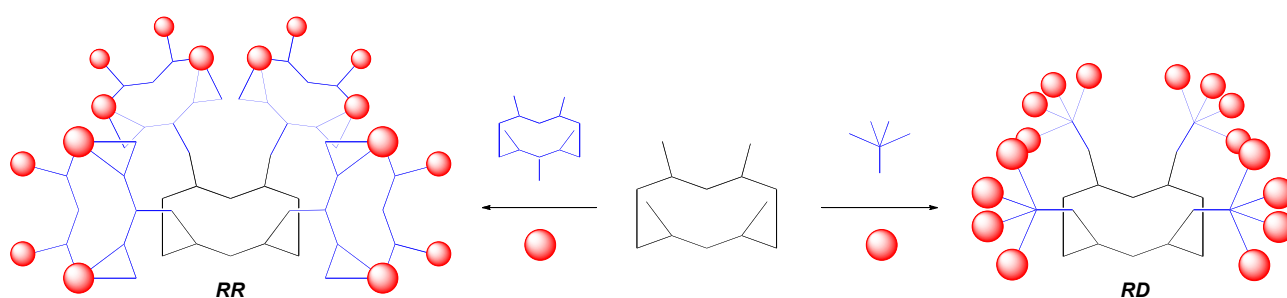


Schéma 41 : Préparation de glycoclusters hexadécavalents par assemblage itératif

Cette stratégie a été appliquée au cours de ce projet pour préparer des glycodendrimères présentant les antigènes Tn et TF. Nous avons également étudié la ligation CuAAC comme méthode alternative pour conjuguer ces unités osidiques.

I.B. Synthèse des châssis hexadécavalents « aldéhyde »

Cette stratégie divergente nécessite la préparation de deux types de cyclodecapeptides : un premier portant des aldéhydes et un second contenant sur la face inférieure une oxyamine et sur la face supérieure des sérines ou des azotures. Pour préparer des RAFT portant des sérines sur la face supérieure et une oxyamine sur la face inférieure, le peptide linéaire **141** est d'abord synthétisé sur support solide. Après clivage de la résine puis cyclisation, le groupe protecteur Alloc est éliminé par l'intermédiaire de Pd(0) et de phénylsilane, ensuite le cyclopeptide est précipité plusieurs fois dans l'éther pour éliminer le catalyseur (*Schéma 42*).

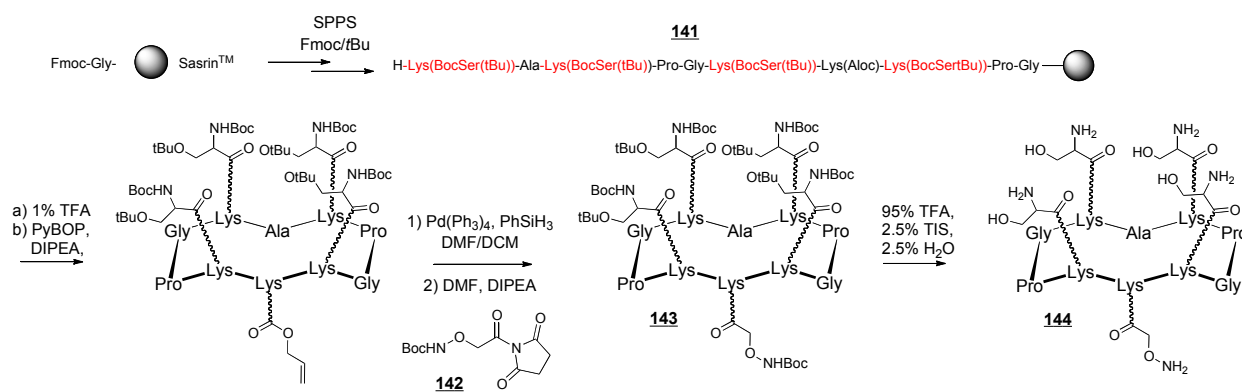


Schéma 42 : Préparation de la plateforme fonctionnelle **144**

Le groupement oxyamine est introduit sur la lysine libre par réaction avec l'ester activé **142** (2 équivalents) dans le DMF en présence de DIPEA (pH 8) (Schéma 42). Le mélange est laissé sous agitation 1h30 à température ambiante puis précipité dans l'éther pour obtenir le cyclopeptide protégé **143**. Pour finir, les groupes protecteurs acido-labiles sont clivés à l'aide d'un mélange TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5) et le RAFT **144** est obtenu après purification par HPLC. La réaction entre **120** et **144** est effectuée dans les conditions d'oximation classique : le RAFT central **120** est dissous dans un mélange H₂O/TFA puis 6 équivalents de l'oxyamine **144** sont ajoutés et la réaction chauffée à 37°C. Après 1h, l'analyse par HPLC analytique indique que la réaction est complète, le mélange est alors purifié par HPLC pour éliminer l'oxyamine en excès. Le châssis RR **145** portant 16 sérines est ainsi obtenu avec un rendement de 93%. Pour finir, ces 16 sérines sont transformées en 16 aldéhydes par action du périodate de sodium (10 équivalents par site) dans l'eau. Après 30 minutes, le mélange est directement purifié par HPLC pour obtenir la plateforme fonctionnelle **146** qui permettra la conjugaison des sucres par un nouveau couplage oxime (Schéma 43).

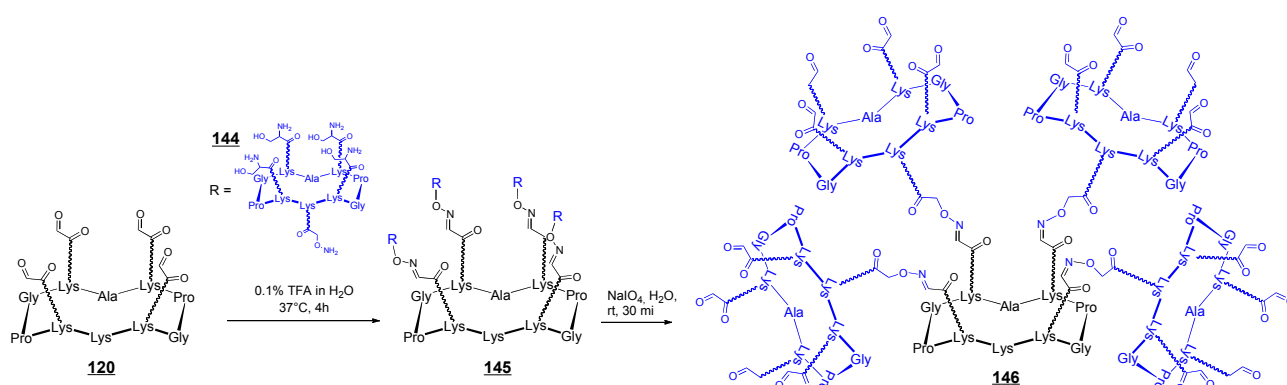


Schéma 43 : Stratégie de synthèse des châssis hexadécavalents portant 16 aldéhydes

I.C. Synthèse des châssis hexadécavalents « azoture »

La préparation du châssis RR portant 16 azotures est assez similaire à la précédente. Le RAFT linéaire **147** constitué de quatre lysines modifiées par des azotures a été dans un premier temps synthétisé sur support puis décroché et cyclisé en solution pour obtenir le peptide cyclique **148** (Schéma 44). Le groupement protecteur Boc a été éliminé par une solution de TFA/CH₂Cl₂ (6:4), puis après précipitation dans l'éther, le cyclopeptide a été directement repris dans une solution de DMF/DIPEA (pH 8) et le groupement oxyamine **142** est introduit comme décrit précédemment pour **143** (Schéma 42).

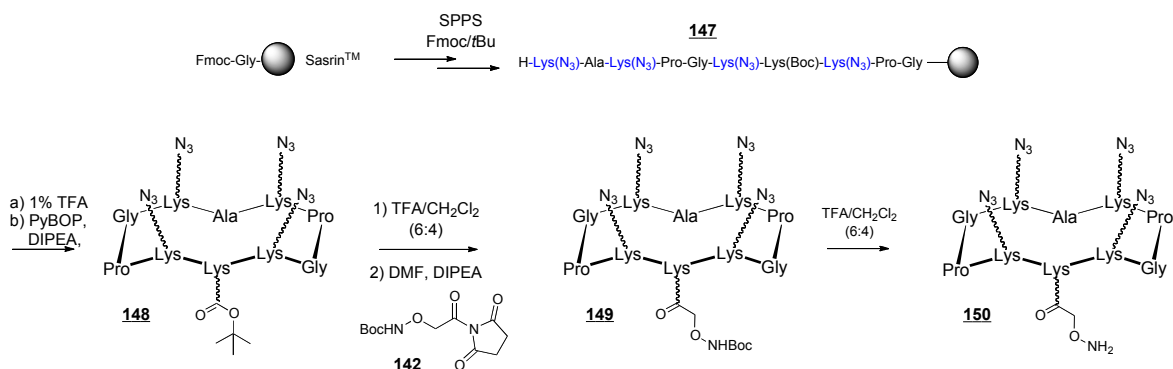


Schéma 44 : Préparation de la plateforme fonctionnelle **150**

Après avoir précipité plusieurs fois le peptide dans l'éther, le groupement protecteur Boc a été clivé pour libérer l'oxyamine et le peptide **150** a été purifié par HPLC semi-préparative. Le couplage de ce composé avec le cyclopeptide **120** a été réalisé à 37°C dans une solution H₂O/CH₃CN (7:3) contenant 0,1% de TFA.

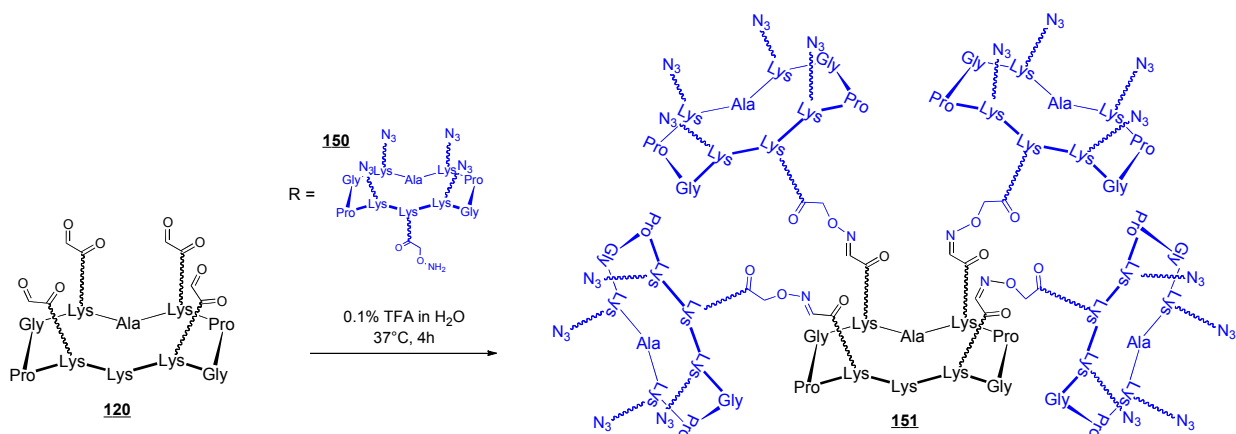


Schéma 45 : Stratégie de synthèse des châssis hexadécavalents portant 16 azotures

Après 1h, l'analyse par HPLC montre que le couplage est complet car tout le RAFT **120** a été consommé (Figure 52). On observe uniquement le cyclopeptide portant l'oxyamine ajouté en excès

et le produit **151** formé comme le confirme l'analyse UPLC-MS (*Figure 52*). Le mélange a finalement été purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir le châssis RR **151** avec un rendement de 86% (*Schéma 45*).

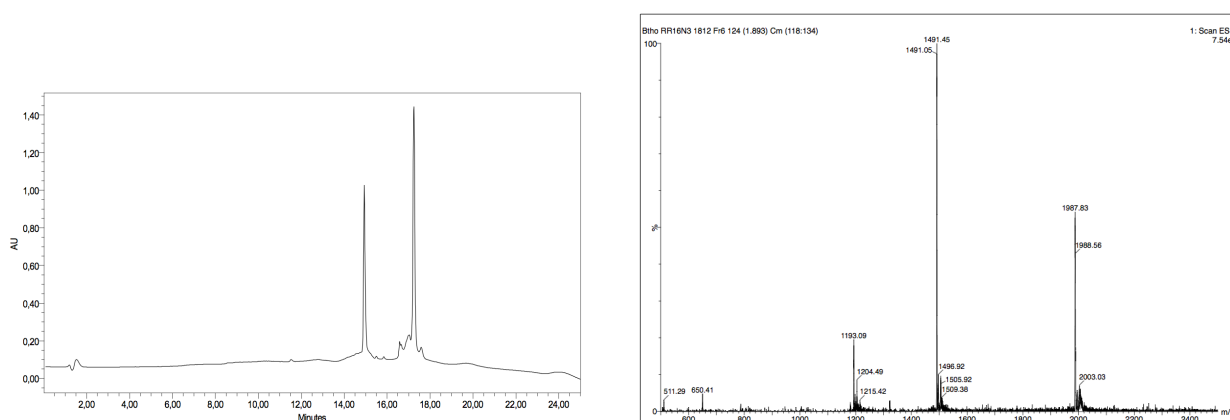


Figure 52 : a) Suivi du couplage oxime par HPLC b) Spectre ESI-MS du composé **151**

I.D. Assemblage par ligation oxime

La plateforme multivalente RR portant 16 aldéhydes a d'abord été fonctionnalisée avec des sucres de structure simple (α -Fuc, β -Fuc, α -Man) puis avec les antigènes tumoraux α -Tn et α -TF oxyaminés. Le RR 16 aldéhydes **146** a été dissous dans de l'eau contenant 0,1% TFA puis l'oligosaccharide oxyaminé (2 équivalents par site) a été ajouté et la réaction chauffée à 37°C (*Schéma 46*).

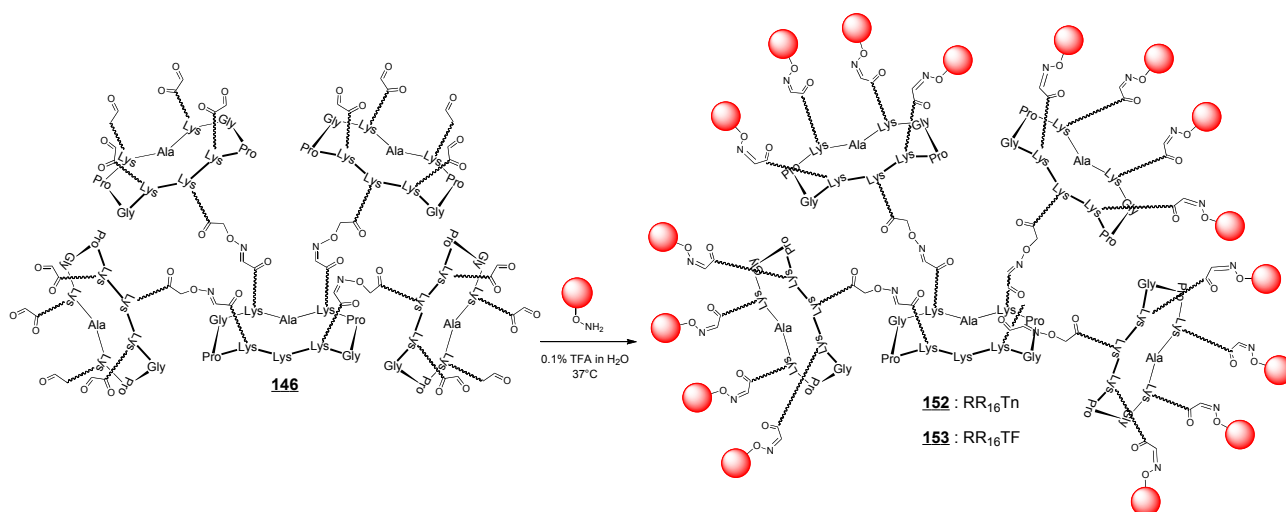


Schéma 46 : Introduction des dérivés osidiques α -Tn ou α -TF sur la plateforme **146** par OL

Après 1h30, l'analyse par UPLC-MS confirme que le couplage est complet (*Figure 53*), le mélange a alors été purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir les homoglycoclusters hexadécavalents correspondants avec de très bons rendements (α -Fuc 89%, β -Fuc 88%, α -Man 88%). Le composé

RR portant α -Tn a été obtenu dans les mêmes conditions avec un rendement de 90% et une excellente pureté comme en témoigne le profil HPLC du produit brut représenté dans la *Figure 53a*. Dans le cas de l'antigène α -TF, le rendement obtenu est légèrement inférieur (76%) même si, d'après le profil HPLC, aucun sous-produit ne semble se former (*Figure 53b*).

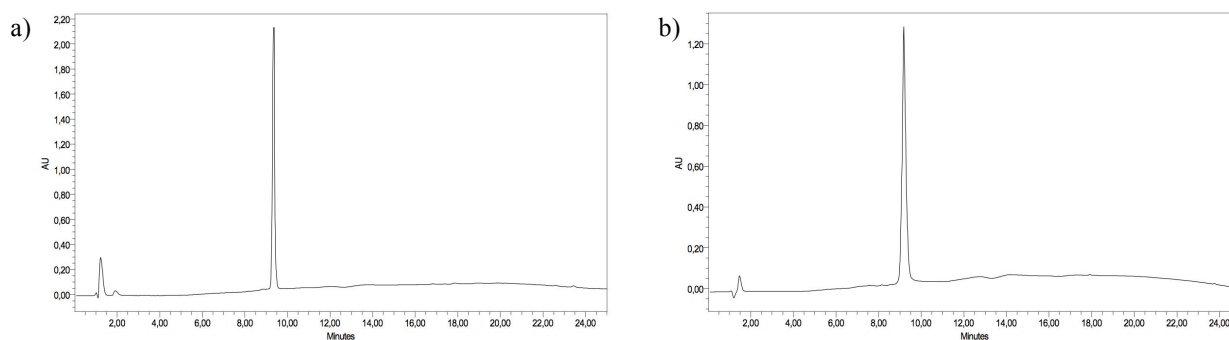


Figure 53 : Suivi HPLC de la réaction de couplage oxime entre 146 et a) α -Tn ou b) α -TF

I.E. Assemblage par ligation CuAAC

Nous avons synthétisé des structures analogues en utilisant la stratégie CuAAC pour conjuguer les les dérivés α -Tn et α -TF propargyle. Pour vérifier la faisabilité de notre approche, nous avons d'abord fonctionnalisé les plateformes hexadécavalentes par des résidus (α -Fuc, β -Gal, α -Man) car la stratégie CuAAC est nettement plus délicate. Nous avons dans un premier temps utilisé la stratégie décrite précédemment, avec du Cu(0) en présence de 2 équivalents par azoture de sucre propargylé. Dans ces conditions, on observe un signal très large en HPLC correspondant à des produits partiellement glycosylés. Nous avons donc choisi d'utiliser la procédure qui nous avait donné les meilleurs résultats pour la synthèse des composés tétravalents. Il s'agit de dissoudre le châssis RR 16 azotures **151** et le résidu osidique portant la fonction alcyne dans du DMF préalablement dégazé puis d'ajouter une solution aqueuse (tampon PBS pH 7,4) contenant du CuSO₄ (16 équivalents), du THPTA (64 équivalents) et de l'ascorbate de sodium (80 équivalents). La solution est ensuite agitée à température ambiante sous atmosphère inerte (*Schéma 47*).

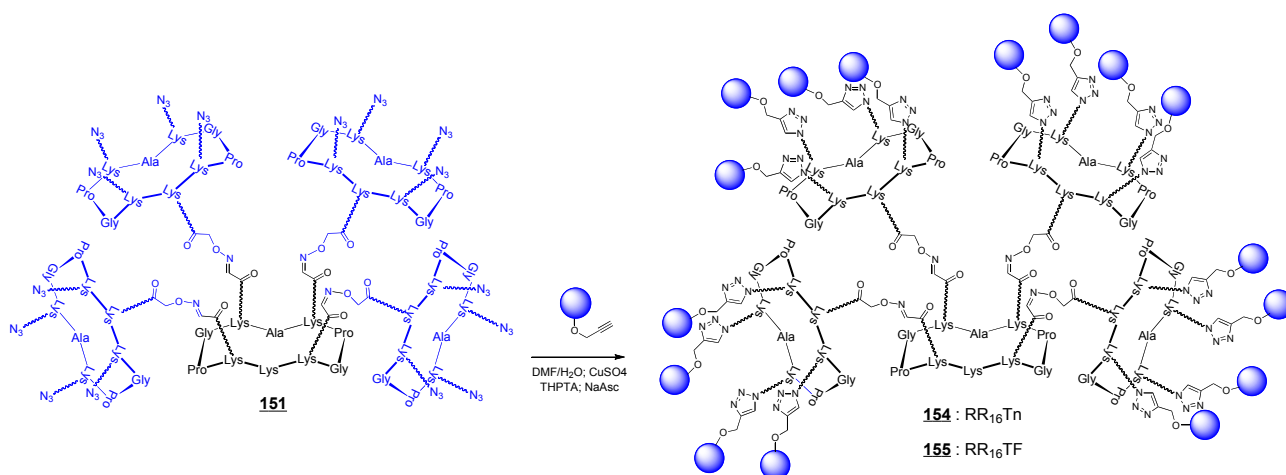


Schéma 47 : Introduction des dérivés osidiques α -Tn ou α -TF sur la plateforme **151 par CuAAC**

La réaction est contrôlée par HPLC analytique et UPLC-MS (*Figure 54a* et *Figure 54b*). Après 3h, de la résine chelex[®] est ajoutée au milieu réactionnel et le mélange est purifié par HPLC semi-préparative. Finalement, les homoglycoclusters RR portant 16 α -Fuc, 16 β -Gal, ou 16 α -Man sont obtenus avec des rendements acceptables compris entre 77% et 85%.

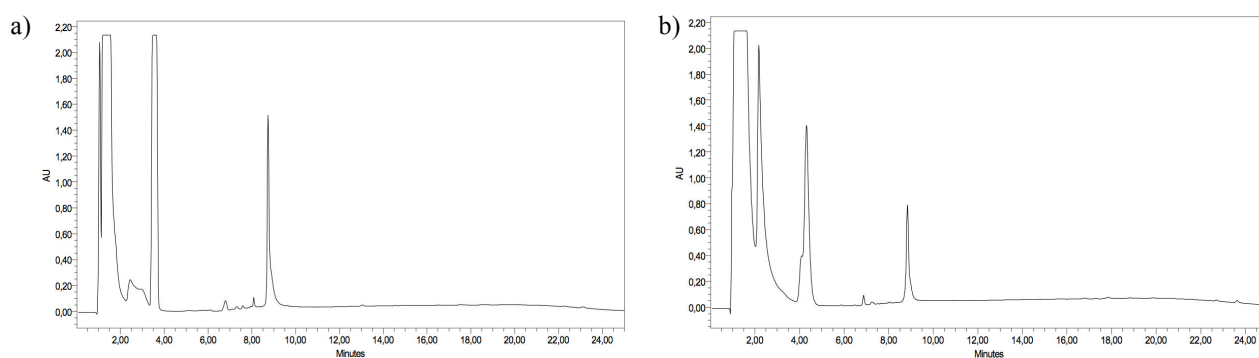


Figure 54 : Suivi HPLC de la réaction de couplage oxime entre **151 et a) α -Tn **87** ou b) α -TF **99****

La même procédure a donc été suivie pour conjuguer des antigènes α -Tn **87** et α -TF **99** au châssis **151**. Les conjugués hexadécavalents correspondants ont été obtenus avec des rendements de 83% et 77% respectivement. Même si l'analyse par spectroscopie de masse de ces composés est plutôt délicate (*Figure 55*) les spectres obtenus permettent de confirmer la structure de nos molécules.

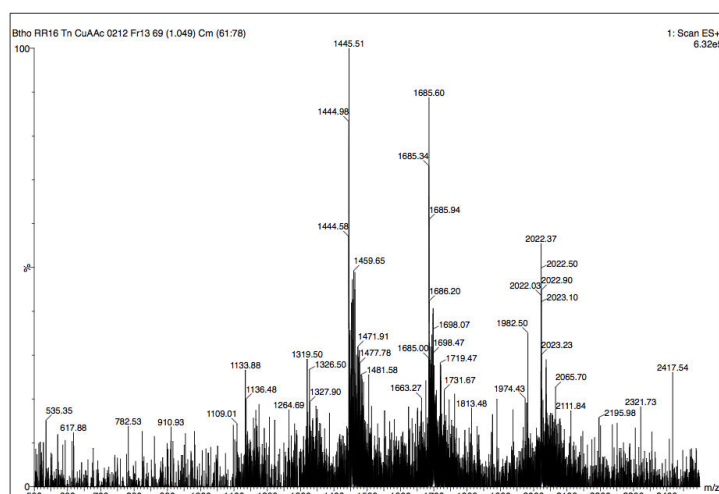


Figure 55 : Spectre ESI-MS du composé 154

I.F. Etude des propriétés biologiques des homoglycoclusters hexadécavalents

- *La lectine PA-III (ou LecB)*

Afin de valoriser la synthèse des constructions fonctionnalisées avec les sucres modèles (autres que les antigènes osidiques), nous avons étudié leurs propriétés de reconnaissance avec des lectines bactériennes, en collaboration avec l'équipe d'Anne Imberty au CERMAV de Grenoble. Nous nous sommes intéressés à *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie gram-négative qui a été isolée comme souche résistante aux antibiotiques. Cette bactérie opportuniste est responsable d'infections pouvant conduire à la mort de patients immunodéprimés ou atteints de fibrose kystique. Cette bactérie produit deux lectines solubles qui semblent jouer un rôle déterminant lors de l'adhésion à la cellule hôte et la formation du biofilm (Figure 56).^[270]

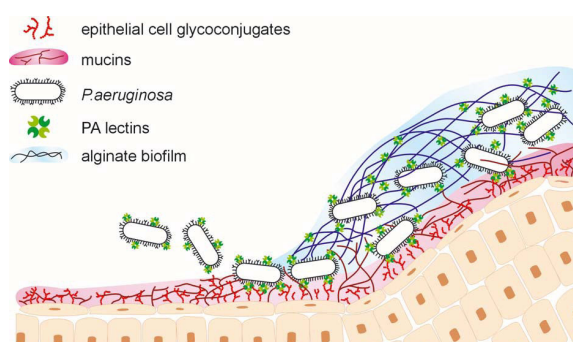


Figure 56 : Formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*

Ces lectines LecA et LecB spécifiques du β -D-Gal^[271] et du α -L-Fuc^[272] respectivement sont tétramériques. Dans le cas de LecB qui nous a intéressé au cours de ce travail, deux ions calcium sont présents dans chaque sous-unité et sont responsables de la haute affinité de cette lectine pour le

fuco. Il a été montré que les glycodendrimères peuvent présenter une alternative au traitement traditionnel par antibiotique, car ils vont entrer en compétition avec les ligands naturels de ces lectines et pourraient ainsi empêcher l'infection par cette bactérie.^[273] Des structures multivalentes décorées avec plusieurs copies de résidu Gal ou Fuc ont notamment montré une forte augmentation de l'affinité vis-à-vis de LecA et LecB grâce au « *glycoside cluster effect* ». Cependant, alors que de nombreuses de structures ont été décrites comme inhibiteur de la lectine LecA seulement quelques ligands existent concernant LecB. On peut citer par exemple les glycodendrimères portant entre 4 et 16 résidus Fuc développés par le groupe de Roy^[274], ou encore l'approche utilisant la chimie combinatoire développée par le groupe de Reymond.^[275]

Les homoglycoclusters hexadécavalents obtenus précédemment nous ont semblé d'excellents candidats pour inhiber l'adhésion de LecB. Nous avons donc testé ces composés et comparé leurs activités avec d'autres homoclusters de valence identique ou non (tetravalent R_4 ou hexavalent R_6 voir *Figure 57*) et d'architecture variable (RR, RD, DR ou DD). Cette étude a permis d'étudier l'influence : *i*) de la valence (de 4 à 16 unités osidiques), *ii*) de l'architecture du châssis (propriétés de rigidité/flexibilité) et *iii*) de la configuration anomérique du ligand (α ou β) sur l'affinité vis-à-vis de LecB.^[276]

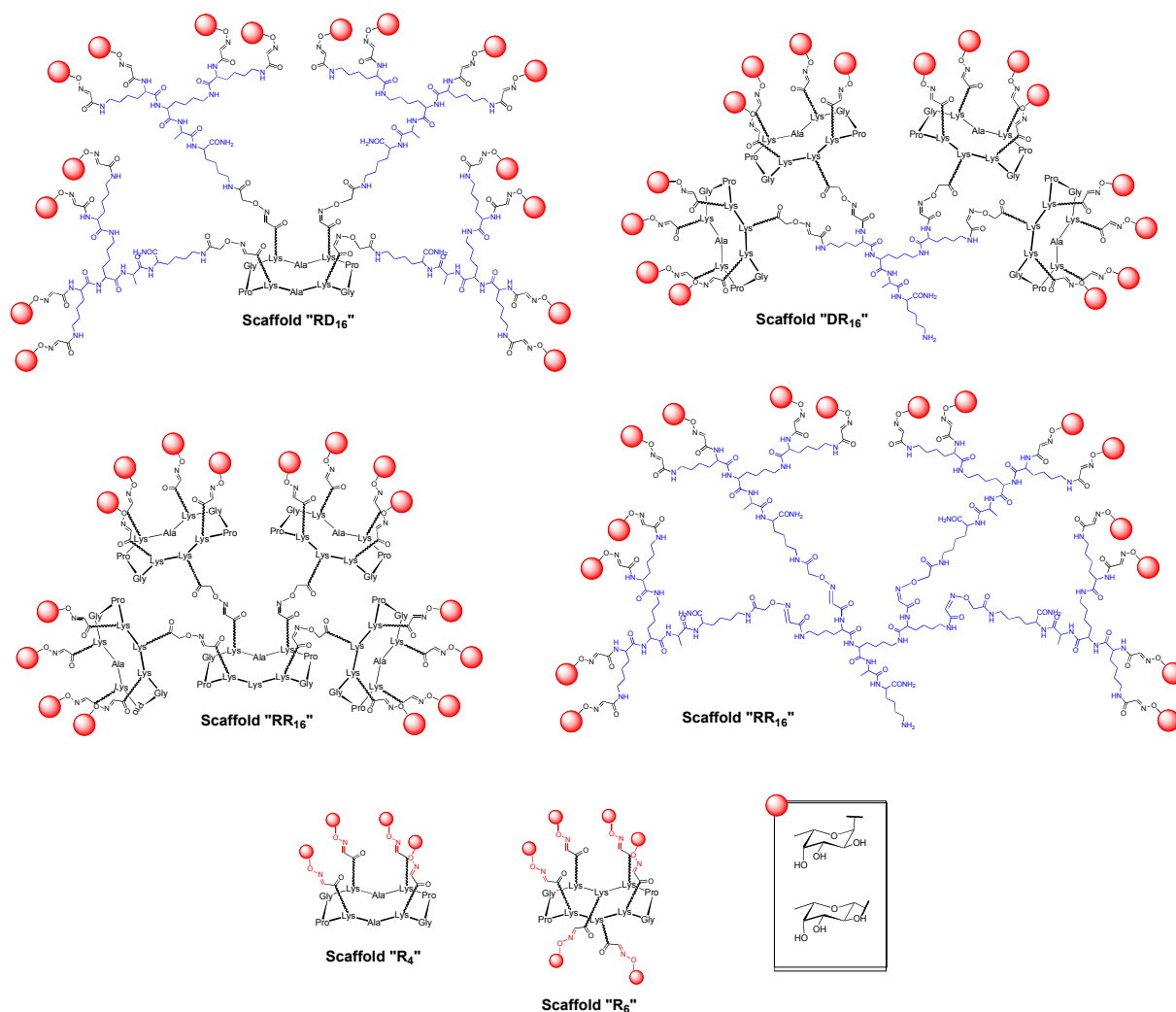


Figure 57 : Structures testées avec la lectine *LecB*

- *Tests biologiques*

Le potentiel d'interaction de nos composés a d'abord été étudié par test ELLA (Enzyme-Linked Lectin Assays) avec la lectine *LecB*. Ces résultats ont été décrits dans la thèse d'I. Bossu et ne seront donc pas détaillés ici. Les principales informations de cette étude sont les suivantes.

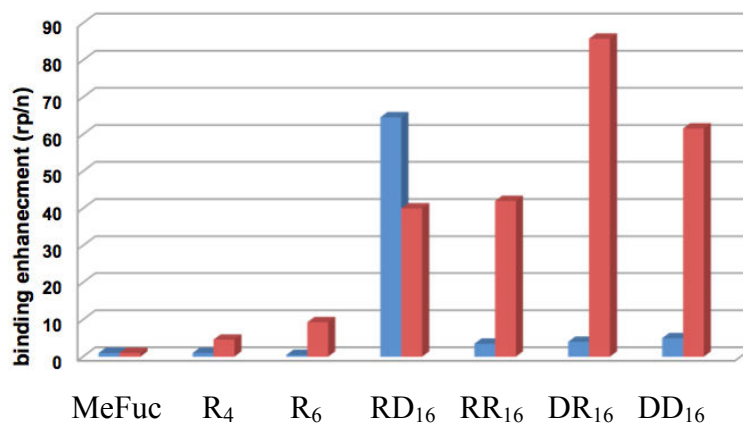


Figure 58 : Potentiel d'interaction déterminé par ELLA des composés R₄, R₆, RR₁₆, RD₁₆, DR₁₆ et DD₁₆ en série α-Fuc (bleu) ou βFuc (rouge)

En série α -Fuc, les dérivés tétravalents et hexavalents montrent seulement une faible amélioration de l'inhibition par rapport au monomère de référence α MeFuc. Une augmentation d'un facteur 10 est observée avec les structures hexadécavalentes, en revanche le composé RD₁₆ α Fuc a montré la meilleure valeur d'IC₅₀ (0,6 nM) mesurée à ce jour pour cette lectine. Cette valeur correspond à un facteur d'amélioration de 1033 par rapport au monomère de référence, et une valeur de rp/n de 65 lorsque cette valeur est rapportée à la valence du dendrimère. D'autre part, tous les ligands de LecB reportés dans la littérature sont des clusters à α Fuc, cependant l'influence de la configuration anomérique n'a jamais fait l'objet d'étude approfondie jusqu'à présent. Ainsi, nous avons cherché à savoir si des structures multivalentes décorées par des résidus Fuc en configuration β pouvaient se lier à LecB, même si le monomère de référence β MeFuc est près de 100 fois moins actif que le monomère α . Nous avons clairement observé que le potentiel d'inhibition augmente avec la valence pour atteindre un facteur d'amélioration de 1400 pour le composé DR₁₆ β Fuc (IC₅₀ de 51 nM). Ces données démontrent que la présentation d'un ligand de manière adéquate, même s'il est de faible affinité, peut conduire à des facteurs d'amélioration très élevés. De plus, nos résultats confirment l'importance de la géométrie et de la valence du ligand sur les propriétés de reconnaissance et suggèrent comme le montrent les données de la littérature qu'il est très difficile de rationaliser le design d'un inhibiteur (*Figure 58*).

Pour confirmer ces résultats et mieux comprendre les raisons des effets inhibiteurs observés, nous avons testé plus récemment les composés RD₁₆ α Fuc et DR₁₆ β Fuc par ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*). Cette expérience a permis notamment de déterminer la stœchiométrie de l'interaction en solution. Nous avons d'abord noté que lorsque la titration est réalisée en mode d'injection direct (c'est-à-dire le ligand ajouté à la lectine présente dans la cellule) aucun résultat n'est exploitable en raison de la formation trop rapide d'agrégats. En revanche, une titration en mode indirect semble plus adaptée car des agrégats n'apparaissent qu'en fin de titration. Les données de stœchiométrie obtenues montrent que les deux clusters DR₁₆ β Fuc et RD₁₆ α Fuc peuvent lier simultanément entre 3 ou 6 monomères de lectine respectivement. Ainsi, ces deux ligands semblent posséder une architecture favorable pour interagir avec plusieurs sites de liaison de LecB comme l'indique la stœchiométrie de l'interaction. Ceci semble indiquer que seulement quelques résidus Fuc sur 16 présents peuvent atteindre le site de liaison de la lectine. Ces deux composés possèdent une affinité pour LecB de l'ordre du nanomolaire, cependant les meilleurs résultats sont obtenus pour le composé (K_D de 28 nM pour RD₁₆ α Fuc et 307 nM pour DR₁₆ β Fuc).

- *Modélisation moléculaire*

Pour proposer un modèle d'interaction du ligand RD₁₆ αFuc, une étude de modélisation moléculaire et de docking a été réalisée à partir des données RMN obtenues lors d'expériences NOESY, DQF-COSY et TOCSY. Deux paramètres ont été pris en compte pour que le Fuc entre correctement dans la cavité : le glycodendrimère doit conserver exactement la même position que celle qu'il occupe dans sa structure cristallographique, puis il doit avoir la meilleure coordination possible avec les ions calciums présents dans les sites de fixation des résidus Fuc. Des contraintes de distance ont été ajoutées afin de maintenir le Fuc dans la bonne position et l'énergie du complexe a été minimisée et soumis à une dynamique moléculaire contrainte. Finalement, nous obtenons le modèle indiqué dans le *Figure 59* qui montre que le glycodendrimère RD₁₆ αFuc, grâce à sa taille et son apparente flexibilité, peut facilement se lier à quatre monomères de lectines comme le suggèrent les données de stœchiométrie.

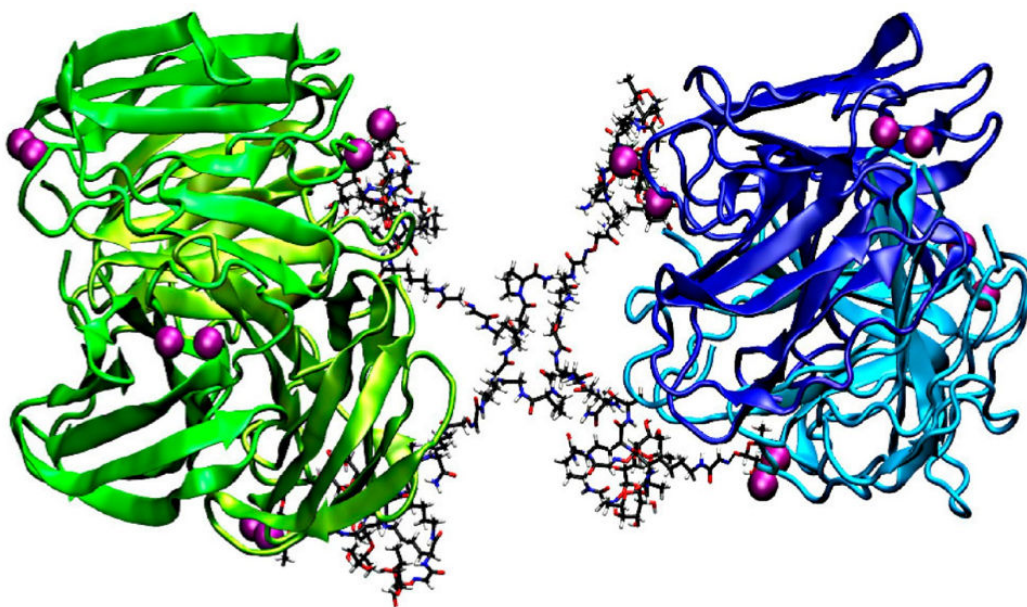


Figure 59 : Modèle moléculaire du complexe LecB- RD₁₆ αFuc

De plus, il apparaît probable que les sucres non impliqués dans l'interaction soient toujours disponibles pour interagir avec d'autres lectines, ce qui pourrait expliquer le phénomène d'agrégation observé en fin de titration. Un mécanisme de type chélate agrégatif semble donc le plus plausible pour expliquer la forte interaction observée avec ce ligand.

I.G. Construction des candidats vaccins hexadécavalents

Pour préparer des vaccins portant 16 antigènes osidiques, nous avons employé la même stratégie que celle décrite pour les clusters tétravalents puis nous avons introduit un peptide immunostimulant par pont disulfure sur le domaine inférieur. Une fois les homoclusters 16 α -Tn et 16 α -TF oxyaminés et propargylés synthétisés et purifiés, l'étape suivante a consisté à introduire une cystéine-NPys **128** sur la lysine libre. Contrairement aux exemples décrits au *Chapitre I*, cette réaction a été nettement plus délicate puisque seules des traces du produit attendu ont été observées par HPLC dans les conditions décrites précédemment en raison de problèmes de solubilité. En effet, les composés **152** à **155** sont très hydrophiles en raison de leur taux de glycosylation élevé, ce qui les rend plus difficiles à solubiliser dans le DMF (*Schéma 48*).

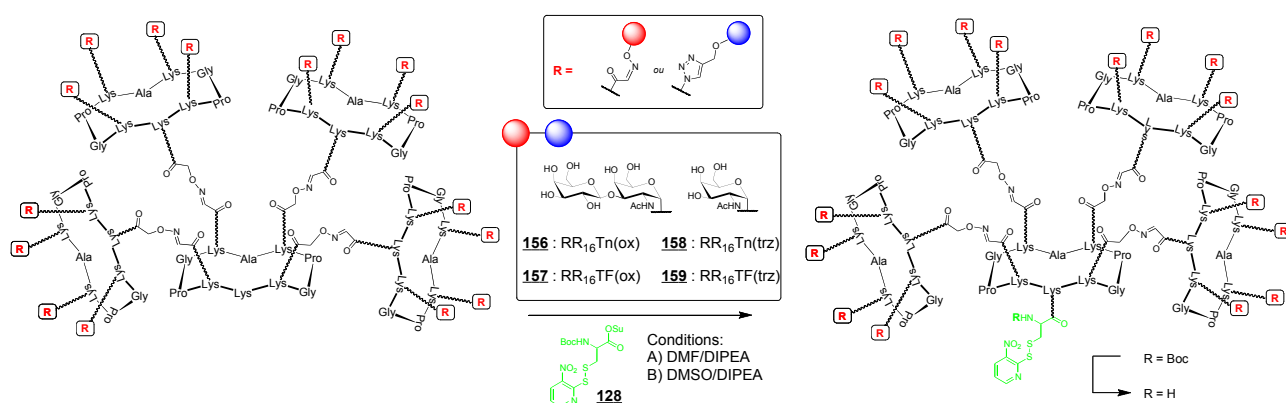


Schéma 48 : Introduction du résidu Cys-NPys **128 sur la face inférieure des homoclusters hexadécaéquivalents**

Ce problème a été partiellement résolu en utilisant du DMSO en présence de DIPEA. Le taux de conversion reste cependant faible pour ces quatre composés. De plus, nous avons observé l'apparition de produits secondaires si la réaction est laissée trop longtemps à pH basique, ce qui montre clairement que cette étape doit encore être optimisée. Ensuite la déprotection successive des Boc ne présente pas de difficulté et les homoglycoclusters résultants (*Schéma 48*) sont prêts à être conjugués au fragment peptidique contenant les épitopes CD4⁺. Les homoclusters portant l'antigène Tn **156** et **158** sont ainsi obtenus avec des rendements respectifs de 45% et 41% après purification. Dans le cas du TF, les rendements sont encore plus faibles, 35% pour **157** et 32% pour **159**.

Le choix de ce peptide immunostimulant n'est pas anodin puisqu'il influe sur l'efficacité et le type de réponse immunitaire induite. Comme nous l'avons mentionné en introduction, notre équipe a montré que la conjugaison d'épitopes peptidiques CD4⁺ et CD8⁺ permet d'induire une réponse humorale et cellulaire qui conduit à l'amélioration de la survie chez la souris. Sur la base de ces travaux, nous avons sélectionné deux fragments peptidiques issus de la protéine ovalbumine : OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu) comme épitope CD8⁺ et OVA₃₂₂₋₃₃₉ (Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg) comme épitope CD4⁺. Ces deux

fragments ont été synthétisés « bout-à-bout » par synthèse automatisée en stratégie Fmoc/tBu sur résine Rink-amide MBHA (Schéma 49). Ici encore, une cystéine est placée sur l'extrémité C-terminale pour la future conjugaison par formation de pont disulfure. Une fois l'élongation du peptide terminé, il est décroché de la résine en utilisant une solution de TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1). Pour finir le peptide **160** est purifié par HPLC semi-préparative (Schéma 49).

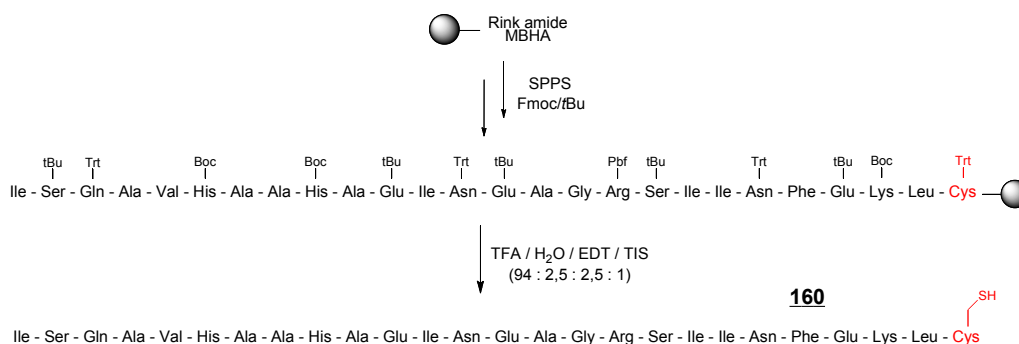


Schéma 49 : Synthèse du peptide immunostimulant OVA

Ce peptide a été conjugué sur les composés **156** à **159** dans les conditions classiques. Dans tous les cas, les profils HPLC montrent que la réaction de couplage semble marcher, comme en témoigne également la coloration jaune du mélange réactionnel. Toutefois, aucun de ces produits de couplage **161** à **164** n'a pu être caractérisé en spectrométrie de masse ESI ou MALDI, probablement en raison de la fragmentation des liens oximes comme déjà observé pour des composés similaires (Schéma 50).^{[277] [254]}

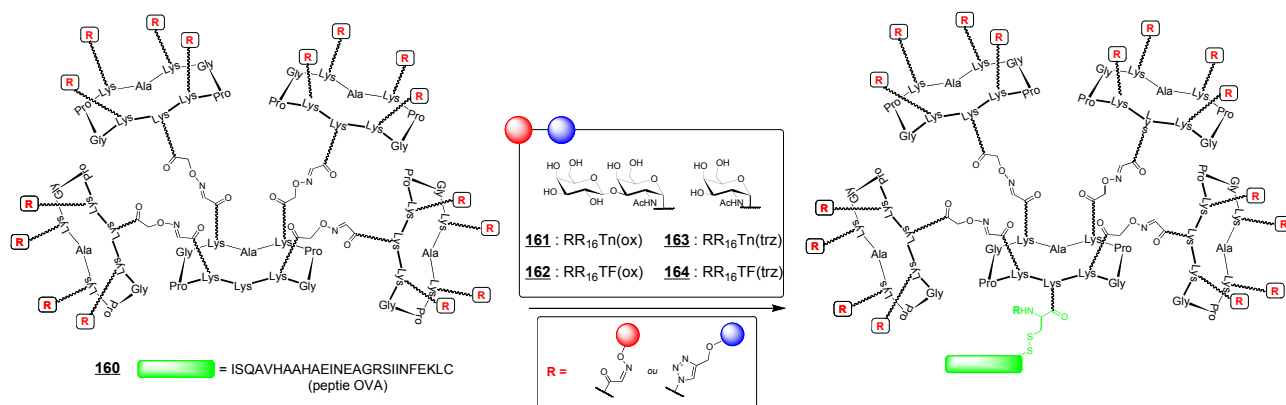


Schéma 50 : Construction des candidats vaccins hexadécavalents en série OL ou CuAAc

Une fois ces problèmes de caractérisation réglés, ces candidats vaccins **161** à **164** seront testés par l'équipe de C. Leclerc et R. Lo-Man à l'institut Pasteur de Paris pour déterminer si la combinaison des antigènes Tn et TF et des épitopes CD4⁺ et CD8⁺ permettent une amélioration significative des effets immunologiques observés avec nos premières générations de vaccins.

II. Assemblage des homoglycoclusters 64-valents

Compte tenu de l'efficacité de la méthode d'assemblage itérative utilisée pour la synthèse des glycodendrimères hexadécavalents (RR_{16} , RD_{16} , DR_{16} et DD_{16}), nous avons cherché à augmenter la valence de nos systèmes afin de tester la robustesse et les limites de ce protocole.^[278] Ainsi, alors que les composés **152-153** sont obtenus en deux cycles « oxydation-oximation » successifs, nous avons étudié la possibilité de réaliser un troisième cycle pour accéder à des composés présentant 64 dérivés osidiques à leur périphérie comme l'illustre la *Schéma 51* ci-dessous.

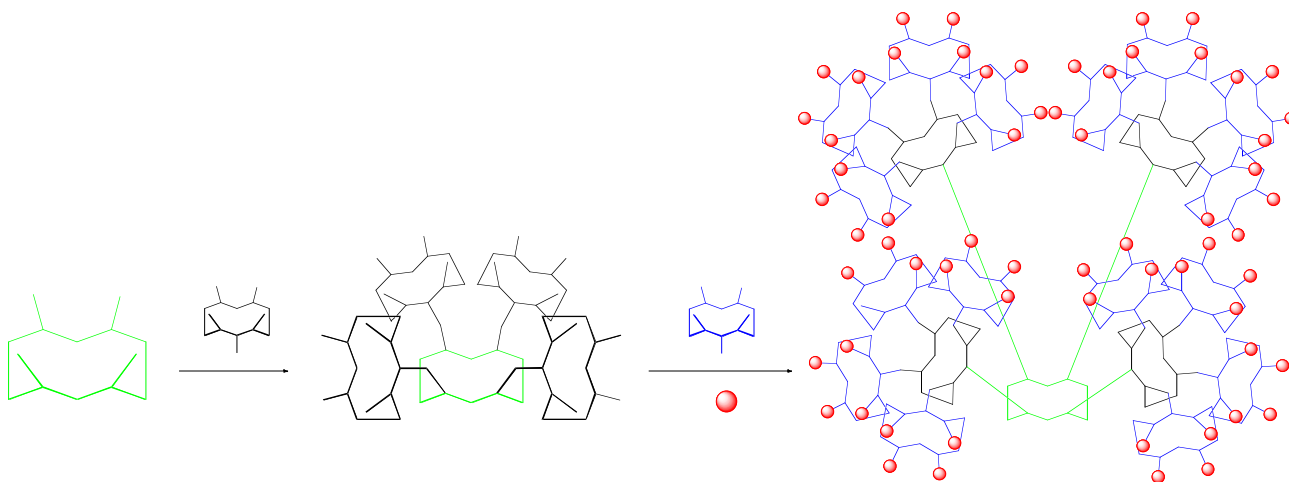


Schéma 51 : Préparation de glycoclusters 64-valents par assemblage itératif

1. Synthèse et caractérisation du châssis 64-valents

Pour réaliser la synthèse du châssis RRR portant 64 aldéhydes, nous sommes partis des composés **146** portant 16 fonctions aldéhydes et le cyclopeptide **144** fonctionnalisé par quatre sérines et une oxyamine (*Schéma 52*). Ces deux produits ont été condensés selon le protocole d'oximation classique en utilisant 24 équivalents de **144**.

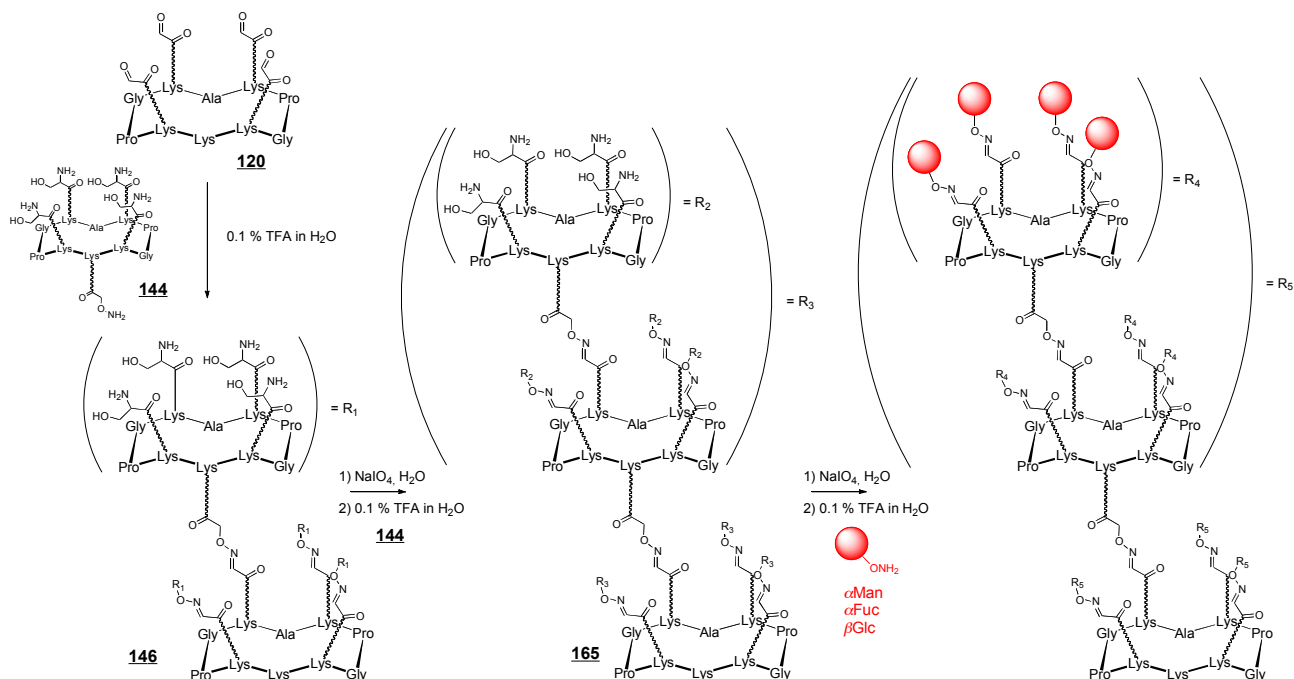


Schéma 52 : Synthèse des glycodendrimères 64-valents selon un protocole itératif en six étapes (trois cycles « oxydation-oximation » successifs)

Après 1 heure de réaction, le profil HPLC analytique ne montre pas l'apparition d'un nouveau produit alors que le pic correspondant à l'excès de **144** n'évolue plus. Cela semble indiquer que la réaction est terminée et que le conjugué **165** possède un temps de rétention identique au produit de départ **146**. Le mélange réactionnel est alors purifié par HPLC semi-préparative et le pic majoritaire a été isolé avec un rendement de 89%. Pour vérifier que ce composé correspond bien au produit attendu **165**, nous l'avons analysé en spectrométrie de masse. Malheureusement, ici encore il a été très difficile d'obtenir un spectre convaincant (*Figure 60*) en raison de la fragmentation des liens oximes pendant l'analyse MS.

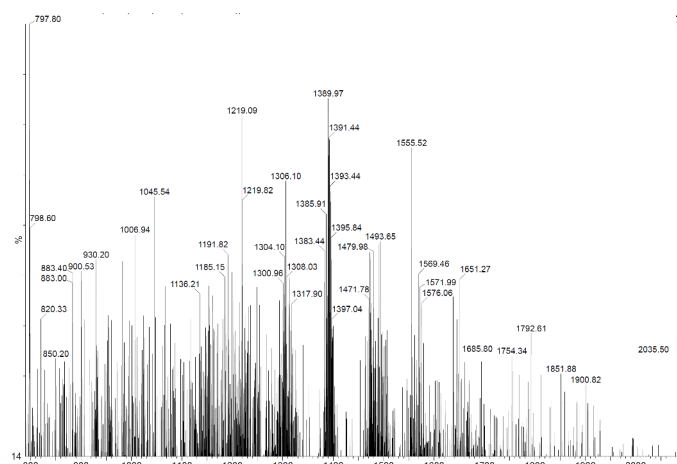


Figure 60 : Spectre ESI-MS du RRR64Ser **165**

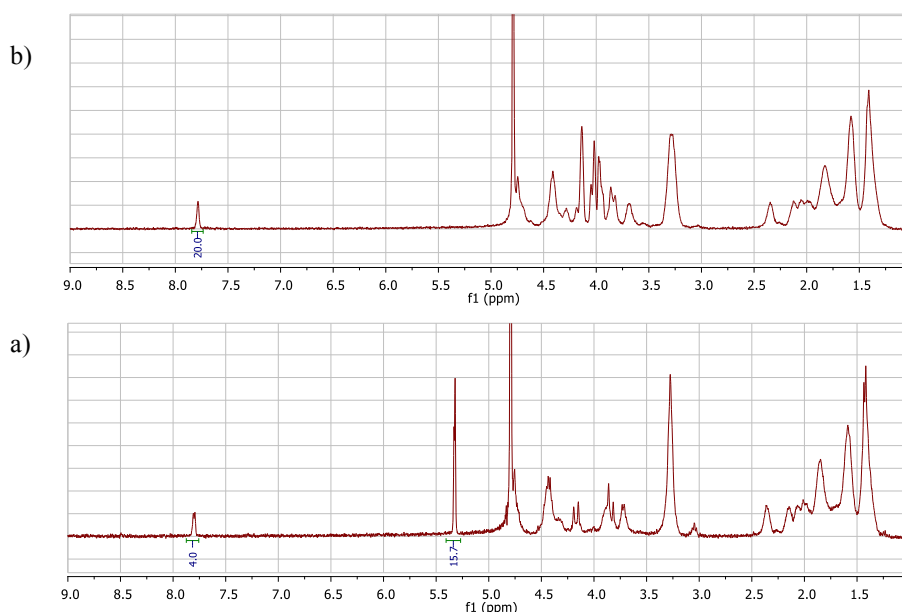


Figure 61 : Spectre RMN ^1H : a) du composé **146** ; b) du composé **165**

En revanche, la spectroscopie RMN a été très utile malgré la taille de ce type de composé (*Figure 61*). En effet, on voit clairement la disparition complète des signaux caractéristiques des fonctions aldéhydes de **146** (sous leur forme hydratée) à 5.32 ppm, et l'apparition d'un signal à 4.14 correspondant aux CH_2 de la chaîne latérale des 64 sérines du composé **165**. On note également la présence de signaux à 7.74 ppm correspondant aux protons des liens éther d'oxime. La réaction suivante de coupure oxydante est réalisée en présence de périodate de sodium dans H_2O pendant 30 minutes. Ici encore, aucune différence de temps de rétention n'est observée pendant la réaction (*Figure 62*). Le produit **166** est obtenu après purification avec un rendement de 88%. Le spectre RMN montre l'apparition d'un nouveau signal à 5.59 ppm correspondant aux fonctions aldéhydes formées (ici 64) et la disparition des signaux correspondant aux CH_2 des 64 sérines.

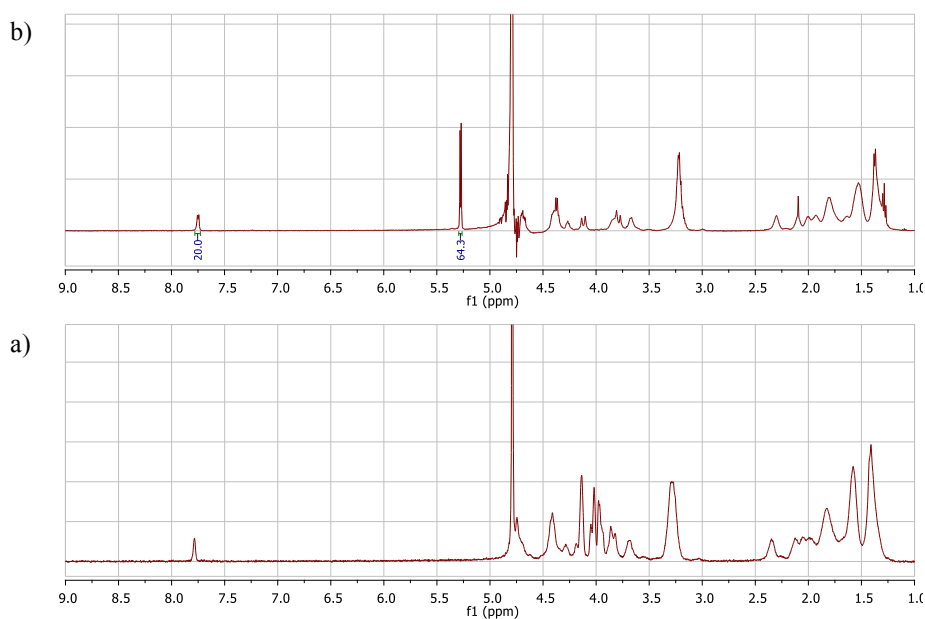


Figure 62 : Spectre RMN ^1H : a) du composé 165 ; b) du composé 166

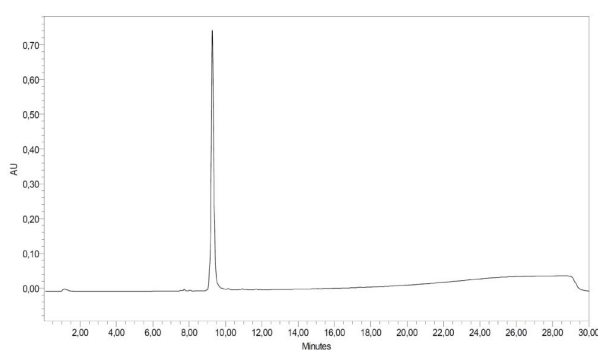


Figure 63 : Profil HPLC du composé 166

Nous avons finalement couplé les motifs oxyaminés α -Fuc et α -Man sur la plateforme peptidique en utilisant la même stratégie que pour les constructions tétra- et hexadécavalentes (*Schéma 52*). Ces dérivés osidiques ont été choisis comme sucres modèles car ils sont plus faciles à préparer que les TACA et sont également intéressants pour valoriser nos composés d'un point de vue biologique. La réaction est chauffée à 37°C pendant 1h30 et on observe un pic unique et fin en HPLC analytique (*Figure 67*). Le brut réactionnel est enfin purifié par HPLC en phase inverse et les homoglycoclusters portant 64 Fuc 167 et 64 Man 168 sont obtenus avec des rendements de 85% et 83% respectivement après lyophilisation (*Figure 64 et Figure 65*).

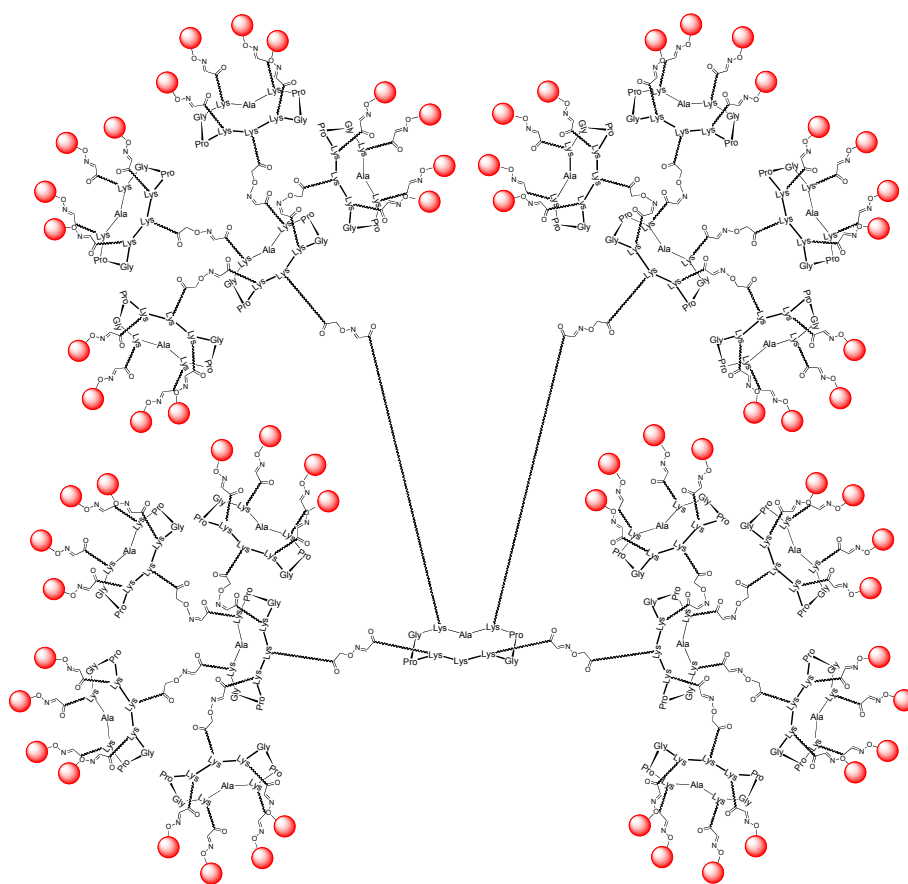


Figure 64 : Représentation du châssis RRR fonctionnalisé par 64 résidus osidiques

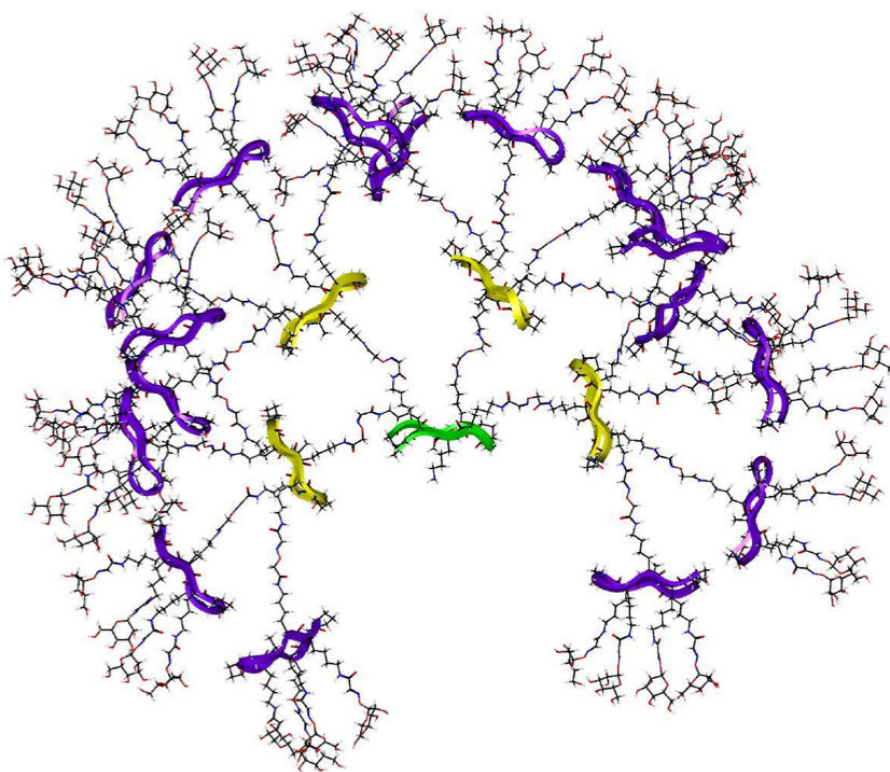


Figure 65 : Modèle moléculaire du composé 168 portant 64 résidus Man

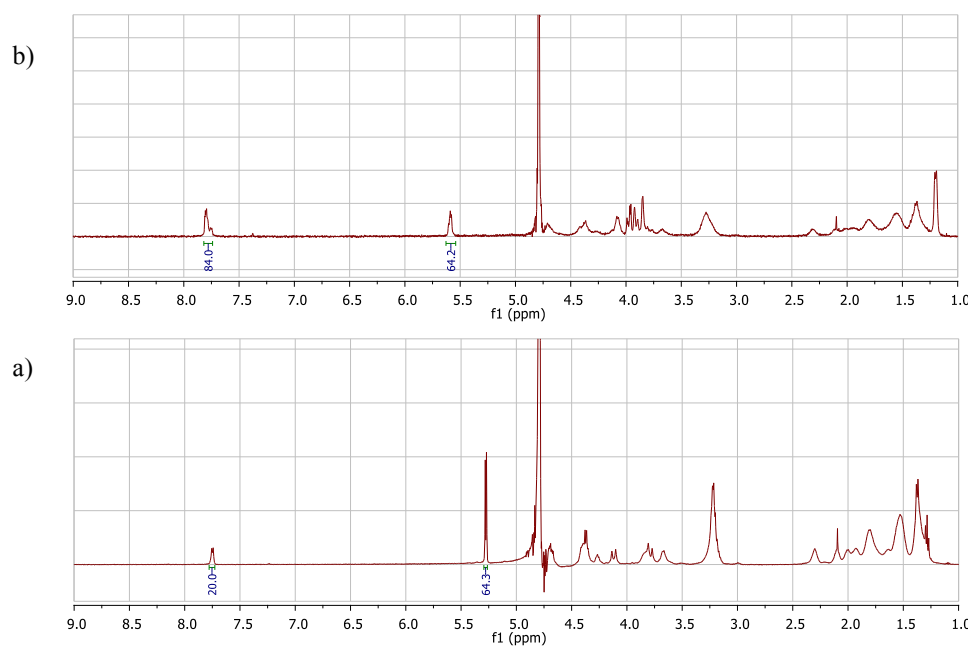


Figure 66 : Spectre RMN ^1H : a) du composé **166** ; b) du composé **168**

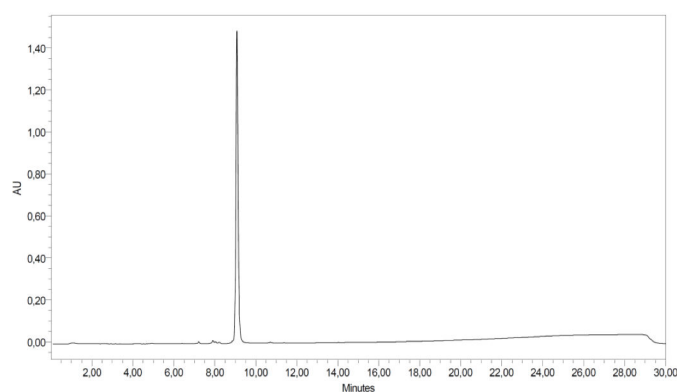


Figure 67 : Suivi par HPLC du couplage oxime entre **166** et le motif oxyaminé α -Man

La principale difficulté a encore été la caractérisation des homoglycoclusters 64-valents car la spectroscopie de masse a montré ses limites pour les composés comportant des liens oximes. Ce problème est renforcé dans le cas des molécules **167-168** qui contient 84 liens oxime, ce qui peut engendrer une dispersion très importante du signal de masse si chaque liaison se fragmente. Or, il est impératif de s'assurer que nous avons bien attaché 64 unités osidiques sur le châssis et que nous n'obtenons pas de structures partiellement glycosylées. Malheureusement, comme nous l'avons évoqué plus haut, le suivi de chaque réaction par HPLC analytique est peu pertinent en raison de la faible différence de polarité entre chaque produit, même si la finesse des pics obtenus peut suggérer l'absence d'un mélange de composé. La spectroscopie RMN a ici encore permis d'obtenir des informations essentielles. Après coulage des sucres, on observe bien la disparition du signal des fonctions aldéhyde comme dans le cas de **146** et l'apparition de nouveaux signaux à 5.59 ppm et 7.79 ppm correspondant respectivement aux 64 liens anomériques et 84 liens oxime attendus.

L'intégration de ces signaux confirme bien ces valeurs, même si la précision de cette mesure est dépendante des paramètres de traitement du spectre RMN.

II.A. Etude structurale

Nous avons donc réalisé des expériences complémentaires pour confirmer ces observations, notamment la RMN DOSY et le dichroïsme circulaire (CD). La DOSY (*diffusion-ordered spectroscopy*) est une technique de RMN à deux dimensions qui permet de déterminer la composition d'un mélange de composés organiques sans séparation préalable. Les molécules sont discriminées en fonction de leur coefficient de diffusion D qui est dépendant du rayon hydrodynamique de la molécule. Nous avons donc réalisé avec J. Garcia ce type d'expérience sur les composés **167-168** et des glycodendrimères partiellement fonctionnalisés (portant entre 30% et 70% de sucre lié) pour vérifier si les structures tronquées sont détectables par cette méthode. Alors que les clusters partiellement fonctionnalisés donnent des spectres DOSY diffus dus à la présence de mélange de composés (*Figure 68a*), des signaux fins et bien définis sont obtenus dans le cas des composés **167-168**, ce qui confirme qu'il y a bien un seul et unique produit présent dans chaque échantillon (*Figure 68b*).

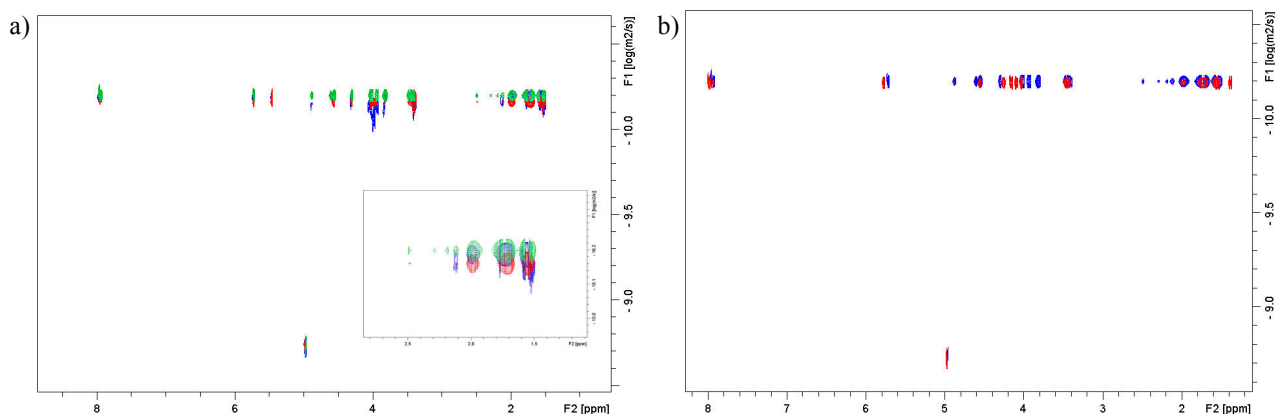


Figure 68 : Spectres DOSY des composés a) **167** (vert) et des glycodendrimères partiellement fonctionnalisés contenant 30% de Man (bleu) et 70% de Man (rouge) ; b) **167** (bleu) **168** (rouge)

Alors qu'un spectre UV est interprétable en raison de la largeur de la bande absorbant à 214 nm, nous avons obtenu des résultats inattendus lors d'expériences de dichroïsme circulaire pour les glycodendrimères **167-168** et pour le châssis non glycosylé **165** portant les 64 résidus sérines (*Figure 69a*). Nous avons observé un « effet Cotton » inhabituel à 245 nm pour le composé **167** RRR₆₄ α -Fuc, alors que ce même phénomène n'est pas observé dans le cas du composé **168** RRR₆₄ α -Man et **165** RRR₆₄ Ser, ce qui semble indiquer que cet effet est dû à la présence des résidus α -Fuc. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons enregistré les spectres CD des composés tétravalents

et hexadécavalents décorés par ce même sucre. Ils montrent un signal similaire à 245 nm mais avec des valeurs d'ellipticité molaire moins importantes (*Figure 69a* composés 1b et 2b). Lorsque l'on reporte cette valeur d'ellipticité molaire au nombre de résidus fucoses par molécule (*Figure 69b*), on obtient une droite passant par l'origine suggérant que ce signal est parfaitement proportionnel au nombre de sucres présents dans la molécule.

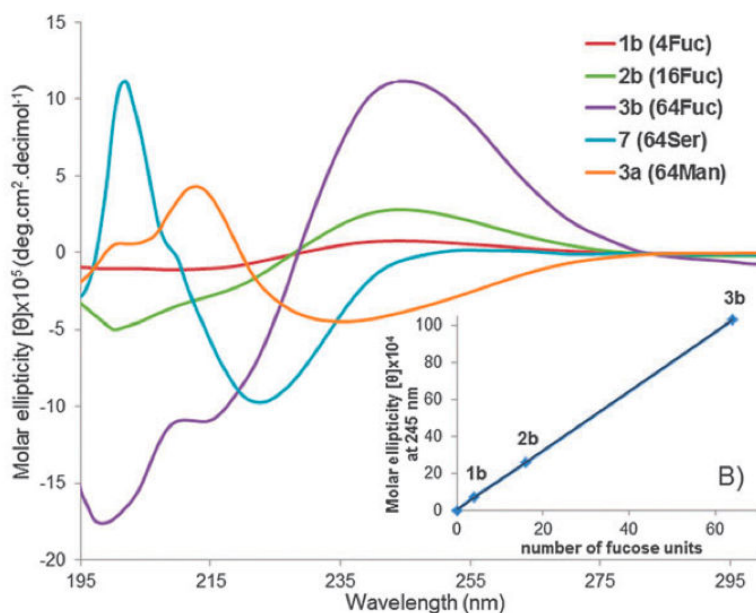


Figure 69 : a) Spectre CD des composés portant 4 Fuc (1b), 16 Fuc (2b), 64 Fuc (3b), 64 Ser (7) et 3a (64 Man) ; b) Représentant la variation d'ellipticité à 245 nm en fonction du nombre de résidus Fuc

Cela semble indiquer que le dichroïsme circulaire peut être utilisé pour déterminer avec précision la valence du glycodendrimère décoré par des α -Fuc. L'ensemble de ces résultats confirme que la plateforme peptidique a été complètement fonctionnalisée et que les glycoclusters résultants **167-168** ont une excellente monodispersité. Il faut noter que cette stratégie itérative permet en seulement 6 étapes (trois cycles d'oxydation/oximation) de synthétiser des homoglycodendrimères de très grand poids moléculaire (37,5 kDa pour **167** et 37,8 kDa pour **168**) avec d'excellents rendements.

II.B. Etude biologique

Afin de valoriser l'intérêt de ces composés d'un point de vue biologique, leurs propriétés d'interaction avec des lectines ont été évaluées par ELLA. Pour cela, nous avons choisi deux lectines végétales : la concanavaline A (ConA) spécifique de l' α -Man et *Ulex europaeus* I (UEA-1) spécifique de l' α -Fuc. Les effets inhibiteurs de ces glycodendrimères RRR₆₄ α Man et RRR₆₄ α Fuc ont été comparés aux composés tétravalents R₄ α Man et R₄ α Fuc et hexadécavalents RR₁₆ α Man et RR₁₆ α Fuc (*Tableau 8*).

Référence	Nb sucres (<i>n</i>) ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	Potentiel relatif (<i>Rp</i>) ^c	<i>Rp/n</i> ^d
αMeMan	1	459 ± 26	1	1
R ₄ αMan	4	15 ± 2	31	7,7
RR ₁₆ αMan	16	10,5 ± 1	44	2,7
RRR ₆₄ αMan	64	0,2 ± 0,1	2295	36
αMeFuc	1	120 ± 15	1	1
R ₄ αFuc	4	1,8 ± 0,3	67	16,7
RR ₁₆ αFuc	16	0,09 ± 0,02	1333	83,3
RRR ₆₄ αFuc	64	0,003 ± 0,001	40 000	625

Tableau 8 : Récapitulatif des données obtenues par ELLA a) Nombre de sucres dans le ligand ; b) Moyenne des trois expériences indépendantes ; c) Potentiel Relatif = IC₅₀ (monomère correspondant à la famille de sucre) / IC₅₀ (inhibiteur) ; d) Potentiel Relatif/sucre = potentiel relatif/n

Comme souvent décrit pour la ConA, des améliorations mineures ont été obtenues pour les composés tétravalents R₄ αMan et hexadécavalents RR₁₆ αMan avec des valeurs de potentiel relatif (*Rp*, ou facteur d'amélioration) par rapport au monomère de référence de 31 et 44 respectivement. L'effet inhibiteur est cependant plus significatif dans le cas du composé 64-valent RRR₆₄ αMan, qui possède un IC₅₀ mesuré à 0,2 μM correspondant à une amélioration d'un facteur 2295 par rapport au monomère de référence αMeMan (Tableau 8). En revanche, en série Fuc, le composé hyperglycosylé RRR₆₄ αFuc a montré un fort potentiel d'inhibition pour la lectine UEA-1 en comparaison des composés tétravalents R₄ αFuc et hexadécavalents RR₁₆ αFuc. Alors que le cluster tétravalent induit un effet modéré de 1,8 μM, le composé de plus haute valence RR₁₆ αFuc montre un facteur d'amélioration de 1333 par rapport au monomère de référence (αMeFuc). En ce qui concerne le glycocluster 64-valents RRR₆₄ αFuc, nous avons mesuré un IC₅₀ de 3 nM, ce qui fait de lui le meilleur inhibiteur reporté à ce jour pour cette lectine. Lorsque l'on rapporte cette valeur d'IC₅₀ à celle mesurée pour le monomère de référence, on obtient un potentiel relatif de 40 000 et qui correspond à une amélioration par sucre (*Rp/n*) de 625.

Chapitre IV Synthèse d'hétéroglyclusters de taille variable

Certains experts estiment que le vaccin « idéal » pourrait combiner plusieurs antigènes tumoraux et plusieurs peptides immunostimulants dans la même molécule.^[279] Ceci permettrait d'induire une réponse contre tous types de cancer (sein, prostate, foie...) à différents stades de la maladie. Des structures de ce type ont été décrites par Danishefsky (*Introduction Figure 17*) et leur intérêt clairement démontré par l'immunothérapie anti-tumorale. Le **troisième objectif de notre travail** était donc de développer une approche synthétique pour accéder de manière contrôlée à des vaccins multi-épitopiques présentant notamment des mélanges de marqueurs osidiques. Il n'existe que très peu de méthodes dans la littérature pour synthétiser ce type de structure glycosylée « hétérogène ». En effet, pendant de nombreuses années la communauté scientifique s'est intéressée à la synthèse de composés présentant un motif osidique unique de manière multivalente (homocluster) pour étudier les interactions sucre-protéine. Or, ce type de structure ne prend pas en compte le fait que les oligosaccharides présents à la surface cellulaire sont exprimés de manière hétérogène et qu'ils jouent un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire. Pour étudier l'influence de ce paramètre sur l'affinité et la sélectivité de ces interactions, une nouvelle famille de structure multivalente présentant plusieurs motifs osidiques *différents*, nommée hétéroglycluster (hGC) a été développée très récemment pour tenter de reproduire cette expression hétérogène (*Figure 53*).

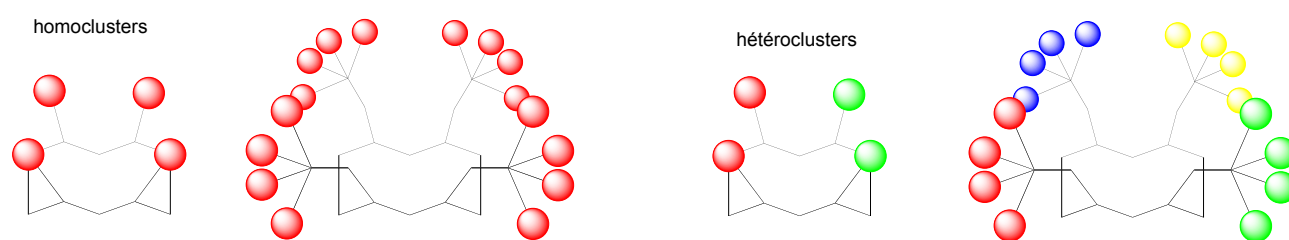


Schéma 53 : Représentation schématique des homoclusters et des hétéroclusters

A. Les hétéroglyclusters

Seulement peu d'études concernant la préparation d'hGC ont été reportées jusqu'à présent. L'approche synthétique permettant d'accéder à ces systèmes est différente de celle employée pour les homoglyclusters. En effet, les clusters hétérogènes ayant une complexité structurale nettement plus importante, le développement de nouvelles stratégies de synthèse est nécessaire pour pouvoir assembler de manière contrôlée et spécifique les sucres sur une plateforme adéquate. Etant donné que les phénomènes de reconnaissance sont fortement liés à la densité des différents motifs

osidiques présentés et à leurs proportions relatives, les hGC que nous allons présenter seront classés suivant ces paramètres. Nous n'aborderons pas ici les méthodes de synthèse non contrôlées où le sucre est conjugué de manière statistique^{[280] [281]} ou par chimie combinatoire dynamique.^{[282] [283]}

1. Structures de faible densité

Le groupe de Lindhorst est l'un des pionniers dans la synthèse d'hGC.^[284] Une première approche basée sur l'utilisation d'une plateforme synthétique de type saccharidique (α -D-galactose) a été développée. Ceci permet de réaliser le couplage orthogonal de motifs osidiques de nature différente (α -D-mannose, α -D-fucose et β -D-lactose). Le α -D-galactose **169** est choisi comme building block central car il possède trois sites de fixation adressables régiosélectivement à travers l'amine secondaire (en rouge), la fonction ester sur le carbone en C-6 (en vert) et l'amine protégée en position anomérique (en bleu) représentés sur le *Schéma 54*.

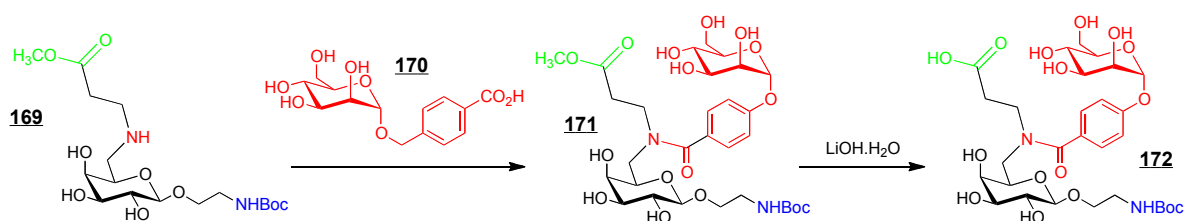


Schéma 54 : Synthèse du composé **172**

Ainsi, le châssis osidique **169** va réagir avec un dérivé de mannose **170**, en présence de HATU comme agent de couplage, puis l'ester de **171** subit une réaction de saponification pour conduire à l'acide carboxylique correspondant (*Schéma 54*). Le disaccharide **172** est obtenu avec un rendement de 79% après purification. Ensuite, ce composé est directement engagé dans un second couplage peptidique avec le dérivé de fucose **173**. La formation du lien amide est réalisée en présence de HATU et le trisaccharide **174** est obtenu avec un rendement de 56%. Le groupe protecteur Boc est finalement clivé pour libérer l'amine correspondante qui va être couplée à un résidu lactose fonctionnalisé par un groupement isothiocyanate **176** par formation d'un lien thio-urée. Enfin, une dernière étape de coupure des groupes protecteurs permet d'obtenir le pentasaccharide **177** avec un rendement global de 37% après purification (*Schéma 55*).

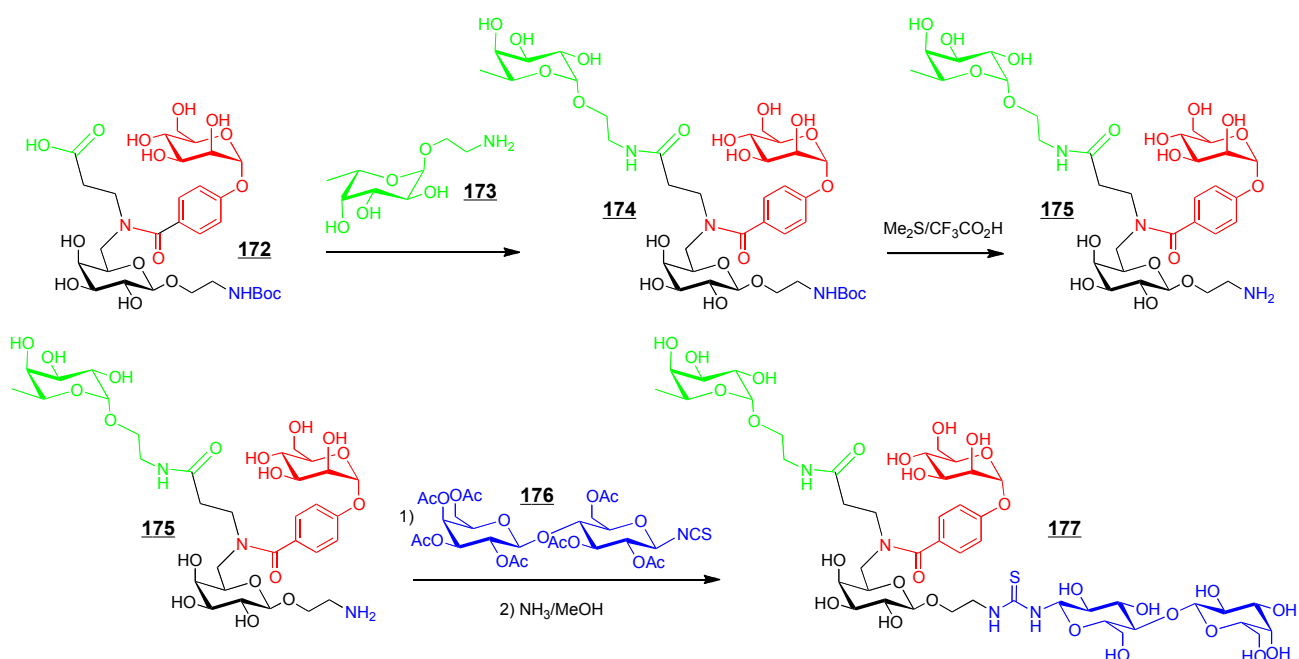


Schéma 55 : Synthèse de l'hGC 177 décrit par le groupe de Lindhorst

En 2007, la préparation d'hGC a été reportée à partir du châssis de type chlorure de méthallyle 178.^[285] Le chlorure de méthallyle possède deux halogènes qui vont être substitués dans une réaction d'éthérisation avec des motifs osidiques, en présence de NaH. Ensuite, l'alcène du chlorure de méthallyle 178 va subir une hydroboration suivie d'une oxydation pour transformer la double liaison en alcool primaire, qui va ainsi pouvoir être de nouveau engagé dans une réaction d'éthérisation. Des glycodendrimères de 2^{ème} génération sont ainsi obtenus par un processus itératif avec des rendements de 40% calculés sur deux étapes (*Schéma 56*).

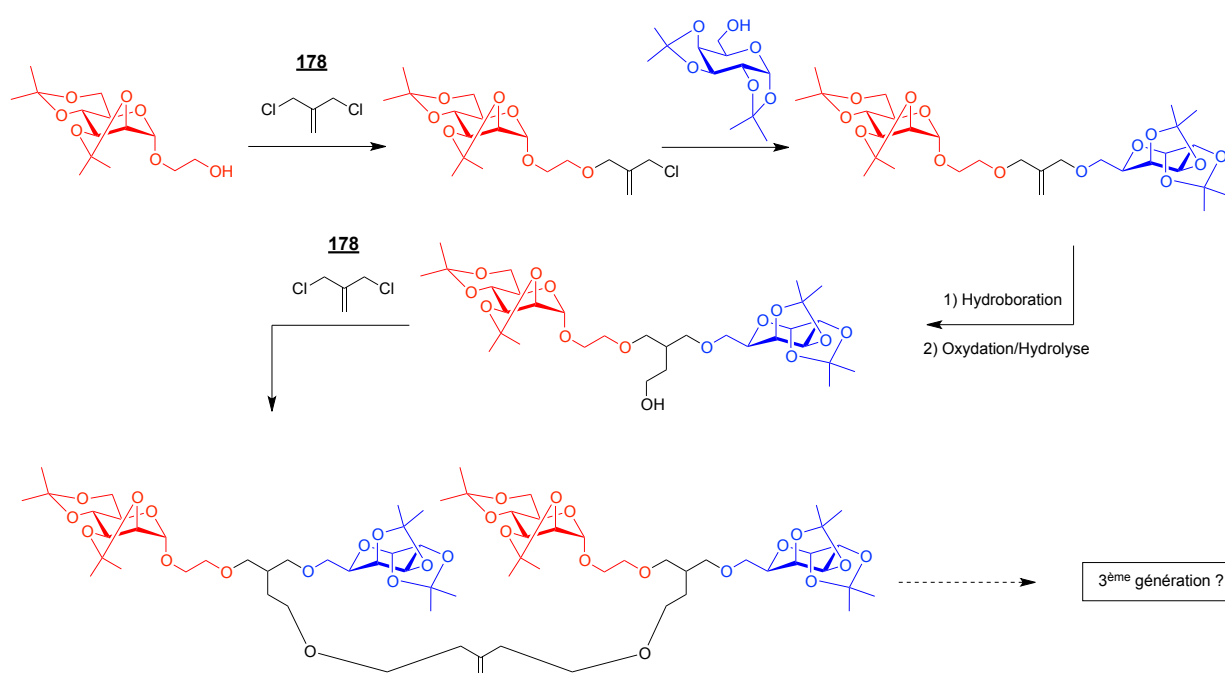


Schéma 56 : Synthèse d'hCG à partir du châssis de type chlorure de méthallyle 178

Toutefois, cette approche comporte deux limitations majeures : *i*) il n'est pas possible d'utiliser un autre groupe protecteur que l'acétal ; *ii*) il est impossible de générer une troisième génération de composé (portant donc 8 unités saccharidiques) avec des rendements et une pureté acceptables.

En 2010,^[286] la synthèse du glycoconjugué hétéro-divalent **183** portant un trisaccharide de mannose et un monomère de mannose sur deux branches séparées et bien distinctes a été décrite (*Schéma 57*). Le diméthyle squarate **180** va servir de plateforme synthétique pour l'ancrage successif du trisaccharide **181** et du monosaccharide **182**, qui ont au préalable été tout deux fonctionnalisés par un bras pentaglycine (*Schéma 57*). Le couplage successif des différents résidus osidiques est rendu possible par un contrôle minutieux du pH durant la réaction : ainsi le glycopeptide **179** est couplé avec un léger excès de diméthyle squarate à pH neutre, alors que l'addition de base (pH supérieur à 8) est nécessaire pour l'addition du monosaccharide **182**.^[287] Finalement, l'hétéroglycocluster **183** est obtenu avec un rendement global de 56% après purification.

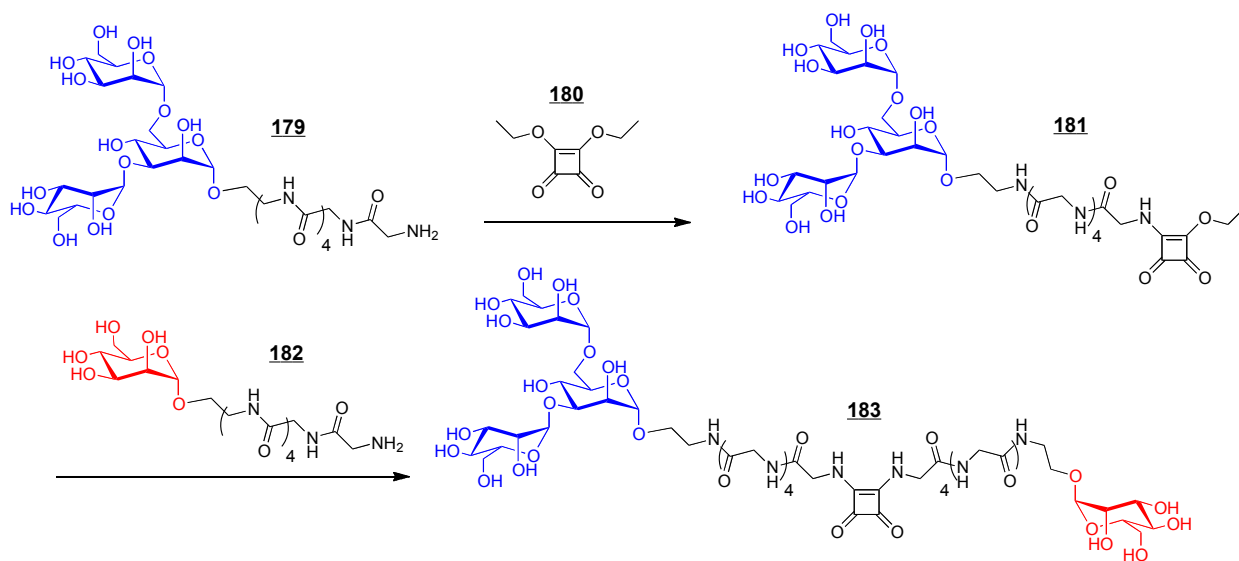


Schéma 57 : Synthèse du glycoconjugué hétéro-divalent **183 portant un trisaccharide de mannose et un monomère de mannose relié par l'intermédiaire du diéthyle squarate **180****

Katajisto et Lönnberg^[288] exploitent les avantages de la synthèse sur support solide (SPPS) et l'orthogonalité de certains groupes protecteurs pour préparer une petite librairie de glycoconjugués hétéro-trivalents. Le building block clé de cette synthèse est le dérivé de β -alanine **184** (α,α -bis(aminométhyle)- β -alanine) portant *trois amines* protégées orthogonalement par des groupes protecteurs *N'*-Fmoc, *N'*-Boc et *N'*-Alloc et *un acide carboxylique* pour le greffage sur bille de résine. Les différentes sérines glycosylées et activées par un ester de pentafluorophényle sont

introduites séquentiellement après clivage du groupe protecteur sur support solide, pour obtenir le dendrimère trivalent **185** avec un rendement global relativement faible de 10% (*Schéma 58*).

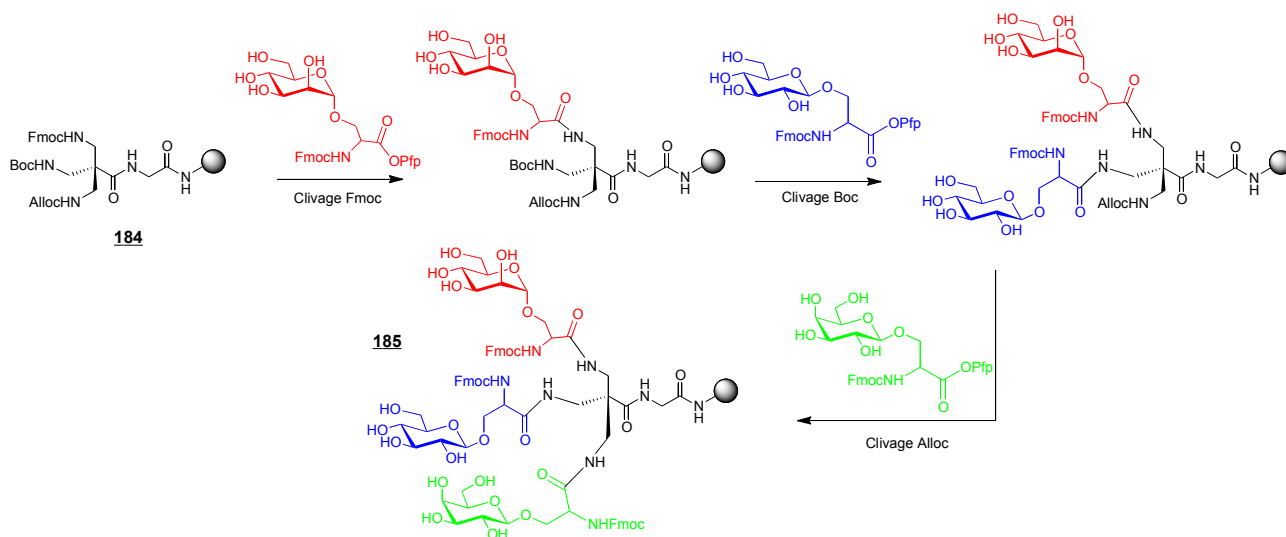


Schéma 58 : Synthèse de l'hGC trivalent **185** proposé par le groupe de Lönnberg

Morvan et ses collaborateurs^[289] utilisent la cycloaddition de Huisgen pour conjuguer des motifs osidiques sur un oligonucléotide et ainsi préparer l'hétéroglycluster **191** portant deux résidus différents (*Schéma 59*). La méthodologie implique la préparation de deux phosphoramidites fonctionnalisés, soit par un groupe bromoalkyle, soit par un groupe propargyle. Les deux dérivés de phosphoramidites sont ensuite incorporés sur une position bien définie lors de la synthèse sur support solide du brin d'ADN modifié (*Schéma 59*). Après le premier cycle de cycloaddition entre le support **186** et un dérivé osidique portant un azoture **187**, les bromes sont substitués par des anions azotures pour obtenir à l'homocluster **188** (*Schéma 59*). Finalement, un deuxième cycle de cycloaddition est réalisé en présence du saccharide propargylé **190** pour former l'hétéroglycluster **191** attendu.

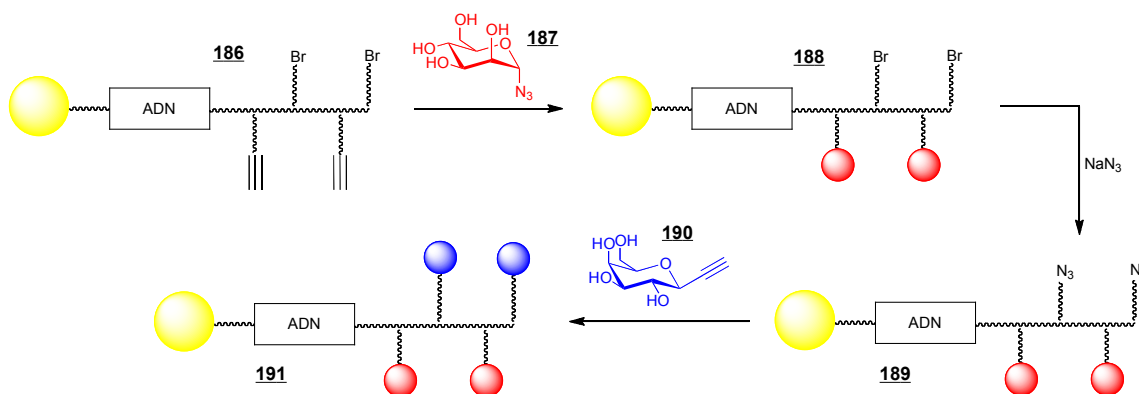


Schéma 59 : Synthèse du glycoconjugué hétéro-divalent **191** par CuAAC

Le groupe de Marra et Dondoni^[230] décrit la synthèse d'un calix[4]arène conjugué avec deux motifs osidiques différents. Ainsi, un dérivé Gal est installé dans le domaine inférieur du macrocycle par ligation CuAAC et un dérivé de Glc est introduit dans le domaine supérieur par ligation TEC. Pour cela, un calix[4]arène **192** fonctionnalisé par des alcènes (sur la face supérieure) et des alcynes (sur la face inférieure) est préparé. Etant donné que les thiols peuvent réagir sur les alcènes (TEC) ou les alcynes (TYC), le couplage CuAAC a été réalisé avant la ligation TEC. Le calix[4]arène **192** est ainsi conjugué au dérivé de Gal **193** (portant un groupement azoture) en présence de Cu(I), puis purifié par colonne chromatographique pour obtenir le composé **194** (Schéma 60) avec un rendement de 56%. Ensuite, le composé **194** est mélangé avec le sucre thiol **195** en présence de DPAP et irradié à 365 nm pour réaliser la ligation thiol-ène et former l'hétérocluster **196** (rendement isolé de 76%). Cette molécule représente le premier exemple où deux méthodes de ligations chimiosélectives sont utilisées pour introduire différents résidus osidiques sur la même plateforme synthétique.

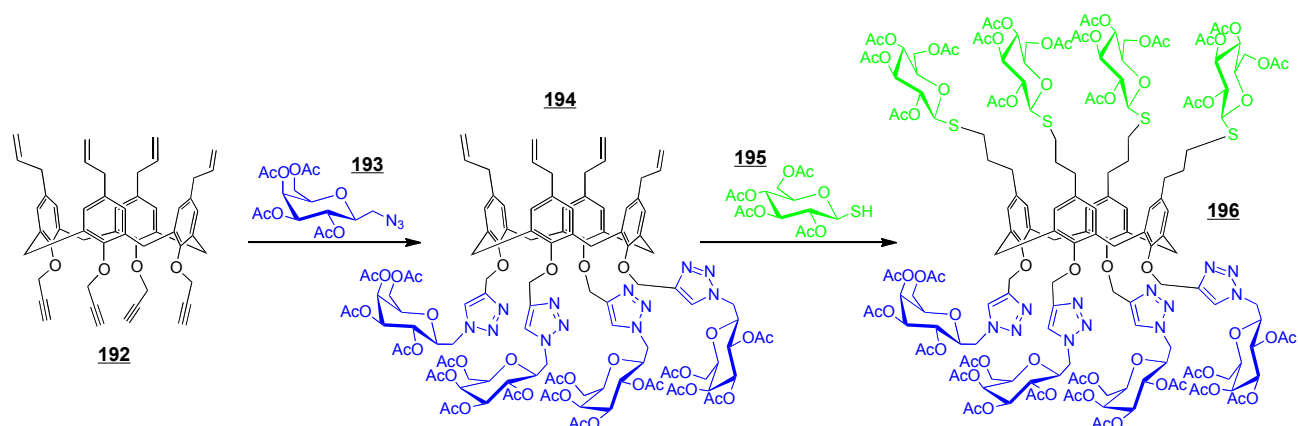


Schéma 60 : Introduction de résidu Gal **193** sur la face inférieure du calix[4]arène **192** par CuAAC et de résidu Glc **195** sur la face supérieure par TEC

I.A. Structures de haute densité

Les phénomènes de reconnaissance protéine-ligand impliquent généralement une forte densité de sucre. Cependant, la grande majorité des clusters dits « de haute densité » décrite jusqu'à maintenant présente un seul type de motif osidique (voir *Chapitre II*). Ainsi, alors qu'une augmentation du degré de multivalence produit une forte amélioration de l'affinité du cluster pour sa cible, il est raisonnable d'imaginer que cette observation peut également s'appliquer au cas des hétéroclusters de haute densité où la présence d'un deuxième motif osidique pourrait avoir un effet complémentaire et bénéfique. Différents termes ont été proposés pour qualifier ce phénomène, notamment « effet hétérocluster ».^[290] Contrairement à « l'effet cluster »,^[263] l'« effet

hétérocluster » peut entraîner une augmentation de l'affinité par des phénomènes synergiques et/ou antagonistes. [291]

Dans ce contexte, l'équipe de Mellet et Garcia-Fernández^[292] [293] a préparé de manière contrôlée une série d'hétéroglycoclusters hyperbranchés possédant une forte densité en sucre, une valence élevée et une excellente monodispersité. Une méthodologie efficace basée sur l'assemblage contrôlé des différents sucres à la surface d'un châssis de type cyclodextrine (β CD) a été mise au point. Pour cela, les auteurs préparent dans un premier temps les hétéroglycodendrons **198-199** par addition radicalaire de sucre thiol (α Man-SH, β Glc-SH ou β Lac-SH) sur le dérivé de pentaérythritol allylé **197** (Schéma 61). Cette réaction permet d'obtenir des glycodendrons mono-, di- et tri-fonctionnalisés en fonction de la proportion relative de sucre thiol utilisé. Les composés mono- et divalents sont ensuite conjugués avec un autre motif osidique pour conduire au hGC **200-201**.

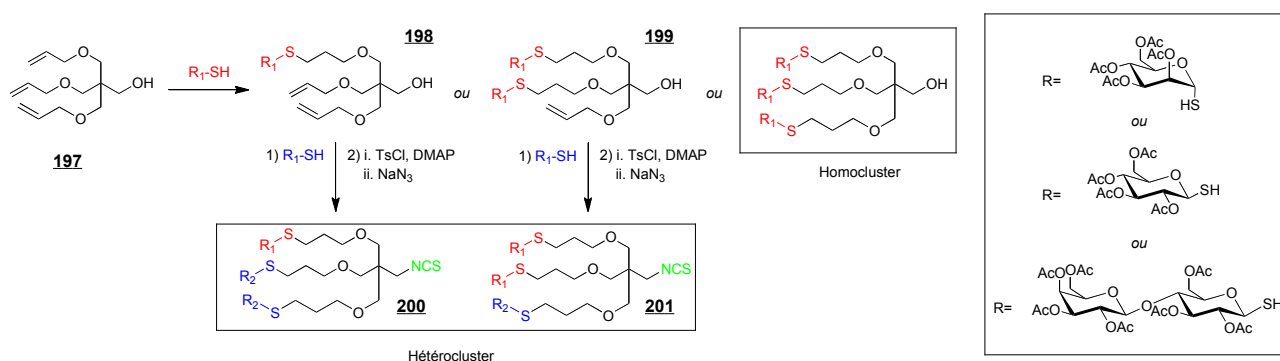


Schéma 61 : Synthèse des glycodendrons fonctionnalisés **200-201**

Les deux ligands **200-201** précédents sont ensuite fonctionnalisés par un groupement isothiocyanate, par une réaction de tosylation suivie d'une substitution nucléophile par de l'azoture de sodium et une réduction de l'azoture en présence de sulfure de carbone (CS_2). Ceci permet la conjugaison sur la cyclodextrine **202** par formation d'un lien thio-urée (Schéma 62).

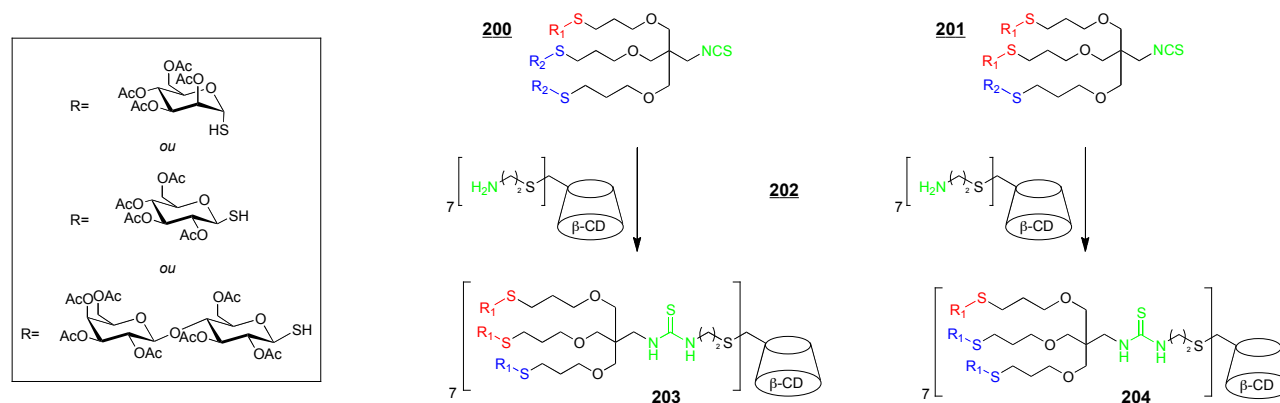


Schéma 62 : Synthèse des hGC de haute densité **203-204**

Le couplage des hétéroglycodendrons **200-201** sur la cyclodextrine portant 7 fonctions amines conduit aux hétéroglycoclusters **203-204** portant 21 dérivés osidiques par molécule avec des rendements aux alentours de 30% (*Schéma 62*). Il est à noter que les différents glycodendrons sont tous orientés dans la même direction (sur la face supérieure du châssis cyclodextrine) ce qui induit une forte densité en sucre. L'ensemble de ces travaux montre qu'il existe différentes méthodes de synthèse d'hétéroglycoclusters. Les méthodologies impliquant les ligations chimiosélectives semblent souvent les plus efficaces et les plus modulaires pour obtenir ce type de structures. Toutefois très peu de combinaisons de ligations ont été testées à ce jour.

II. Travaux antérieurs du laboratoire

Notre équipe a proposé en 2008,^[294] une approche combinatoire et chimiosélective pour la préparation d'une librairie d'hétéroclusters tétravalents. Notre objectif était de développer une méthodologie efficace qui permette d'accéder d'une manière simple et rapide à des mélanges de glycoclusters. Cette approche est basée sur l'assemblage aléatoire de différents éléments structuraux sur la plate-forme peptidique RAFT. Pour cela, nous avons utilisé différents sucres (Man, Lac, Fuc et GalNAc) ou différents acides aminés (chargés positivement (Lys), négativement (Asp) ou possédant une chaîne latérale hydrophobe (Tyr, Phe et Ile)). Chacun de ces éléments fonctionnalisés par un groupement oxyamine a été conjugué par ligation oxime sur le cyclodecapeptide portant les fonctions aldéhydes complémentaires. Des bibliothèques de molécules qui diffèrent par leur composition et la position relative de chaque biomolécule sont ainsi obtenues et ont permis de dresser un profil d'affinité de la lectine ConA. Cette méthodologie a également été appliquée plus récemment pour préparer des candidats vaccins portant des mélanges de Tn et TF et un peptide immunostimulant PV (Schéma 63).^[295] Cependant, le principal inconvénient est que des mélanges de régioisomères difficilement isolables par les méthodes de purification traditionnelle (HPLC semi-préparative) sont obtenus.

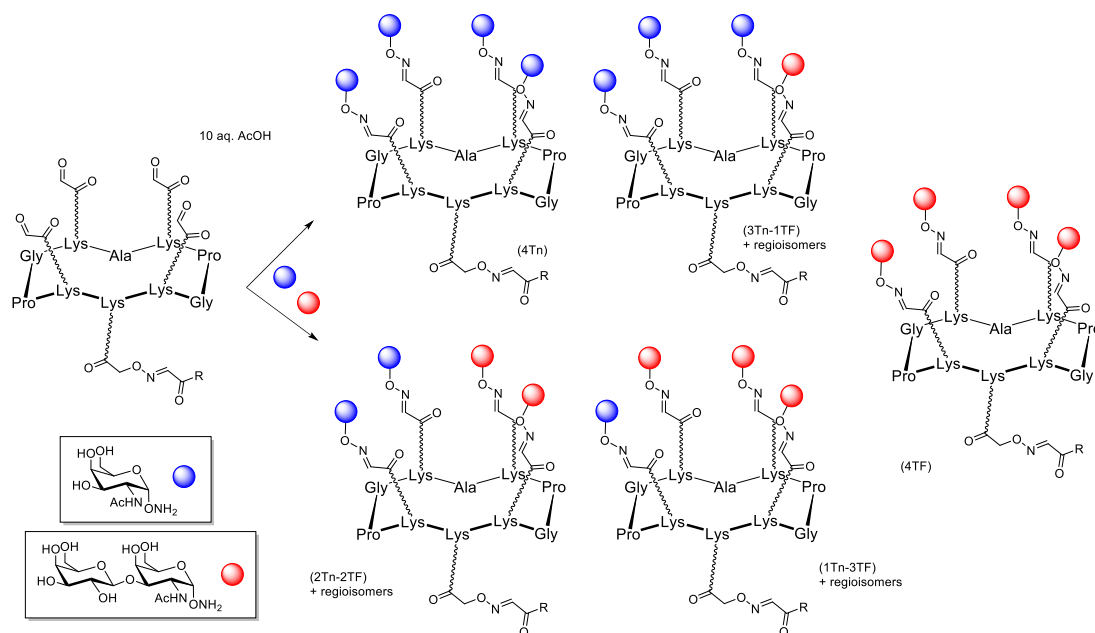


Schéma 63 : Librairie d'hétérocluster tétravalents Tn/TF obtenus suivant une approche combinatoire et chimiosélective

Pour résoudre ce problème, nous avons décidé de combiner plusieurs méthodes de ligation chimiosélective pour réaliser un assemblage contrôlé et obtenir des systèmes hétérogènes de valence (de 4 à 16 motifs osidiques par molécule) et de composition (entre 2 et 4 sucres différents

par molécule) variables. Le premier objectif de notre travail a été d'évaluer la faisabilité de cette stratégie sur des modèles simples, et plus précisément de vérifier si ces méthodes de ligation sont orthogonales et applicables à ce type de structures.

III. Systèmes de faible densité

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur des cyclodecapeptides portant deux types de motifs osidiques sur la même face.^[296] En utilisant deux méthodes de ligation chimiosélectives couramment utilisées au laboratoire, deux séries de composés tétravalents présentant différentes distributions en sucre ont été préparées :

- une première série contenant deux résidus d'un sucre et deux d'un autre, nommée hétéroglycocluster 2 + 2 *Schéma 70* (combinaison 2 + 2).

- une deuxième série contenant trois copies d'un des motifs osidiques précédent et une copie d'un autre, nommée hétéroglycocluster 3 + 1 *Schéma 70* (combinaison 3+1).

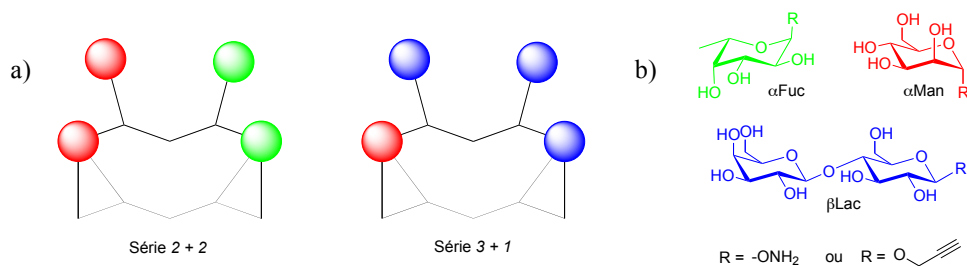


Figure 70 : a) Représentation schématique des hGC en série 2:2 et 3:1 ; b) Sucres utilisés lors de cette étude

1. Série 2 + 2

En plus d'être totalement compatible avec la chimie des peptides et des oligosaccharides, la ligation oxime et la cycloaddition de Huisgen offrent l'avantage d'être parfaitement orthogonales comme nous l'avons montré sur des composés modèles^[297]. La série d'hétéroglycocluster 2 + 2 a été préparée à partir des sucres oxyaminés et propargylés et d'un cyclodecapeptide RAFT portant sur la face supérieure deux lysines fonctionnalisées par des aldéhydes et deux lysines azotures.

Pour préparer le cyclodeptide bi-fonctionnalisé **207**, le RAFT linéaire **205** est synthétisé sur support solide en utilisant deux buildings blocks **Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH** et deux **Fmoc-Lys(N₃)-OH** (*Schéma 64*). Ensuite, après clivage de la résine puis cyclisation, les groupes protecteurs acido-labiles (Boc et tBu) sont clivés à l'aide d'un mélange TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5) pour obtenir le cyclodecapeptide **206** (*Schéma 64*).

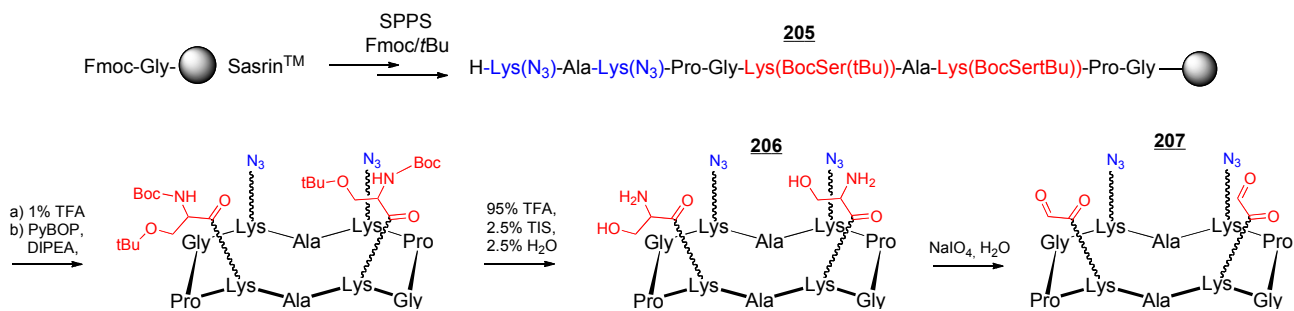


Schéma 64 : Synthèse de la plateforme bi-fonctionnelle portant deux aldéhydes et deux azotures

Enfin, les deux groupements sérines libres vont subir une coupure oxydante par action du périodate de sodium (20 équivalents) pour conduire au châssis **207** portant deux fonctions aldéhydes et deux fonctions azotures sur la même face du cyclodecapeptide (*Schéma 64*).

Nous avons choisi de réaliser la ligation oxime en premier en raison de l'instabilité des aldéhydes glyoxyliques qui les rend délicats à manipuler. En revanche, les azotures sont inertes vis-à-vis des nucléophiles et sont résistants aux conditions d'acidolyse et de la ligation oxime. Ainsi, deux copies des sucres oxyaminés α Fuc, α Man et β Lac sont couplées sur le cyclodecapeptide **207** pour obtenir les composés divalents correspondants (*Schéma 65*). La ligation oxime est réalisée selon les conditions mises au point auparavant, à savoir : à 37°C dans une solution aqueuse contenant 0,1 % TFA, en présence de deux équivalents de résidus osidiques par aldéhyde. Après 3h, une conversion complète est observée par HPLC analytique (*Figure 71a*).

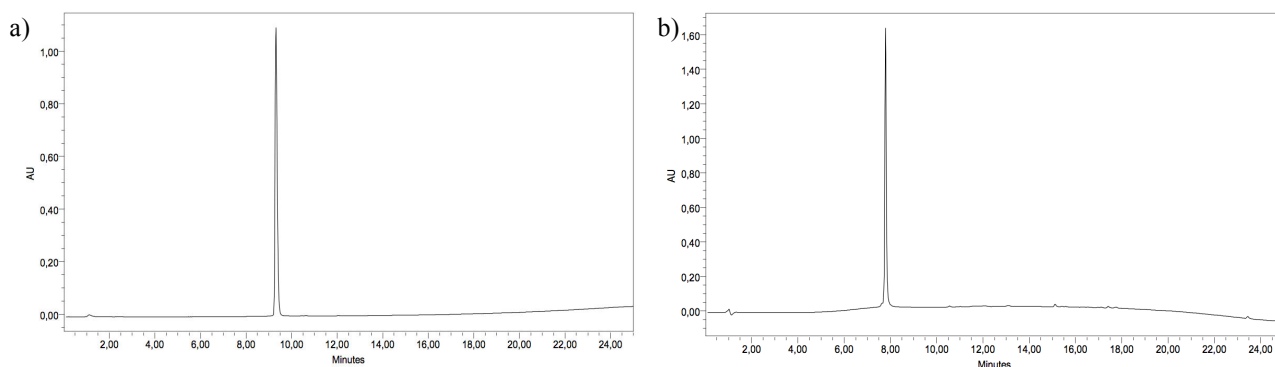


Figure 71 : Suivi HPLC a) du couplage oxime et b) de la cycloaddition

L'excès de sucre oxyamine est piégé par addition d'acétone, puis après élimination de l'eau par lyophilisation, le brut réactionnel est directement engagé dans une réaction de cycloaddition sans purification intermédiaire.

Comme nous l'avons démontré au *Chapitre II*, des homoglycoclusters tétravalents sont obtenus avec de bons rendements en utilisant une quantité catalytique de micro-poudre de Cu(0) dans un mélange isopropanol/tampon acétate d'ammonium. Par conséquent, nous avons réalisé cette réaction dans ces conditions à partir de deux équivalents de sucre propargyle α Fuc, α Man et β Lac par azoture (*Schéma 65*).

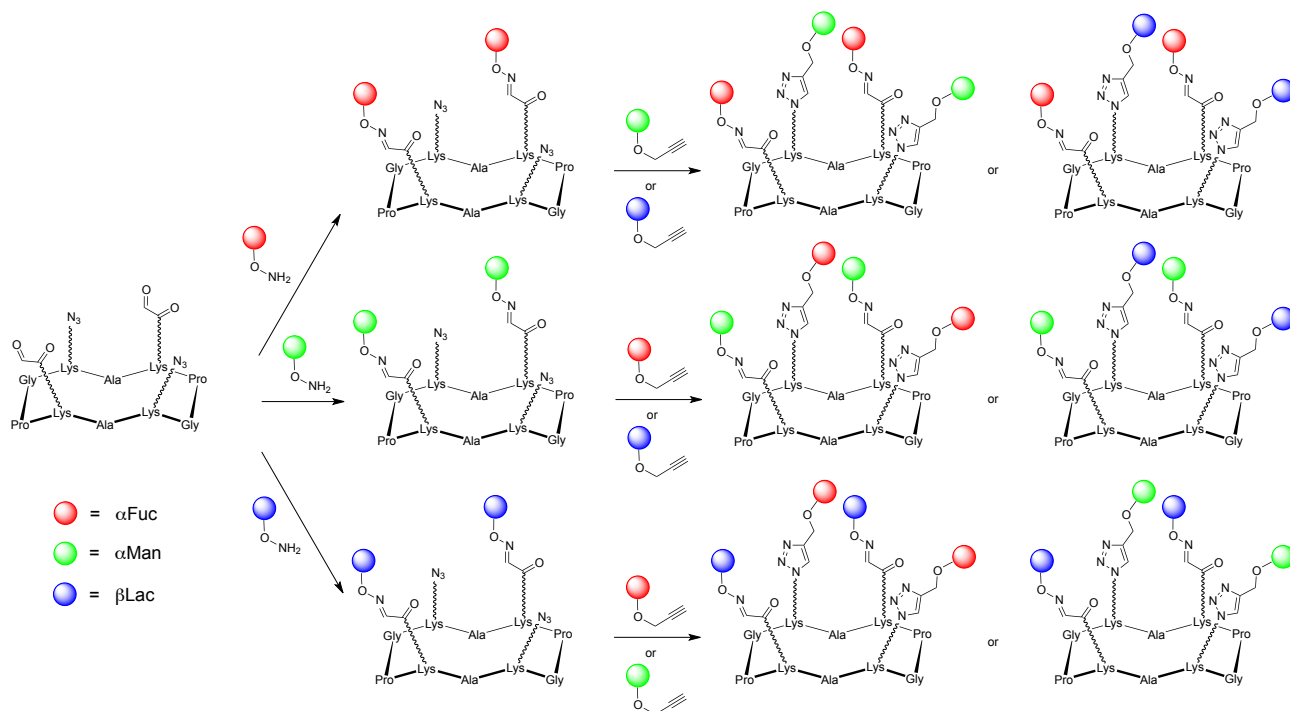


Schéma 65 : Synthèse des hCG en série 2:2

Ici encore, le couplage est quantitatif après 3h comme en témoigne l'analyse par HPLC analytique (*Figure 71b*). Après élimination du cuivre par filtration et purification par HPLC semi-préparative, les six hétéroglycoclusters tétravalents (*Schéma 65*) sont obtenus avec une excellente pureté et de très bons rendements. Les rendements ainsi que le résultat des analyses par spectrométrie de masse pour chaque produit sont regroupés dans le *Tableau 9*.

Composé	Rendement ^a	MS calculée ^b	MS trouvée ^c	t _R (min) ^d
α Man(ox)/ α Fuc(trz)	83%	1885,9	1886,0	7,79
α Man(ox)/ β Lac(trz)	99%	2242,9	2242,3	7,43
α Fuc(ox)/ α Man(trz)	98%	1885,9	1886,0	7,73
α Fuc(ox)/ β Lac(trz)	98%	2210,0	2210,3	7,62
β Lac(ox)/ α Man(trz)	94%	2242,9	2242,2	7,31
β Lac(ox)/ α Fuc(trz)	93%	2210,0	2210,3	7,60

Tableau 9 : Récapitulatif des données expérimentales obtenues en série 2:2 a) Les rendements sont déterminés par HPLC ; b) Masse calculé pour (M + H)⁺ ; c) Les masses sont effectuées en ESI en mode positif ; d) Temps de rétention déterminé par HPLC (gradient linéaire de 5 à 100% en B en 20 min)

III.A. Série 3 + 1

Afin de démontrer la modularité de notre protocole, une nouvelle série d'hétéroglycocluster 3 + 1 a été préparée à partir des mêmes résidus osidiques et du cyclodecapeptide **209** portant un aldéhyde et trois azotures (*Schéma 66*).

Comme précédemment, un RAFT linéaire **208** contenant un building block **Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH** et trois autres **Fmoc-Lys(N₃)-OH** a été synthétisé sur support solide, puis le cyclodecapeptide **209** a été préparé selon le protocole précédent (*Schéma 66*).

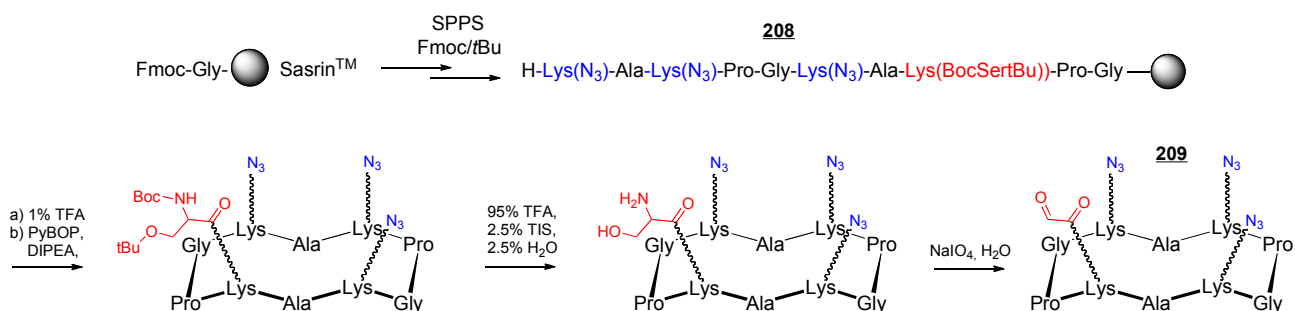


Schéma 66 : Synthèse de la plateforme bi-fonctionnelle portant un aldéhyde et trois azotures

Les deux ligations chimiosélectives successives ont également été réalisées dans les mêmes conditions (à l'exception évidemment de la stœchiométrie des réactifs) pour obtenir des hétéroglycoclusters de composition 3 : 1 (*Schéma 67*).

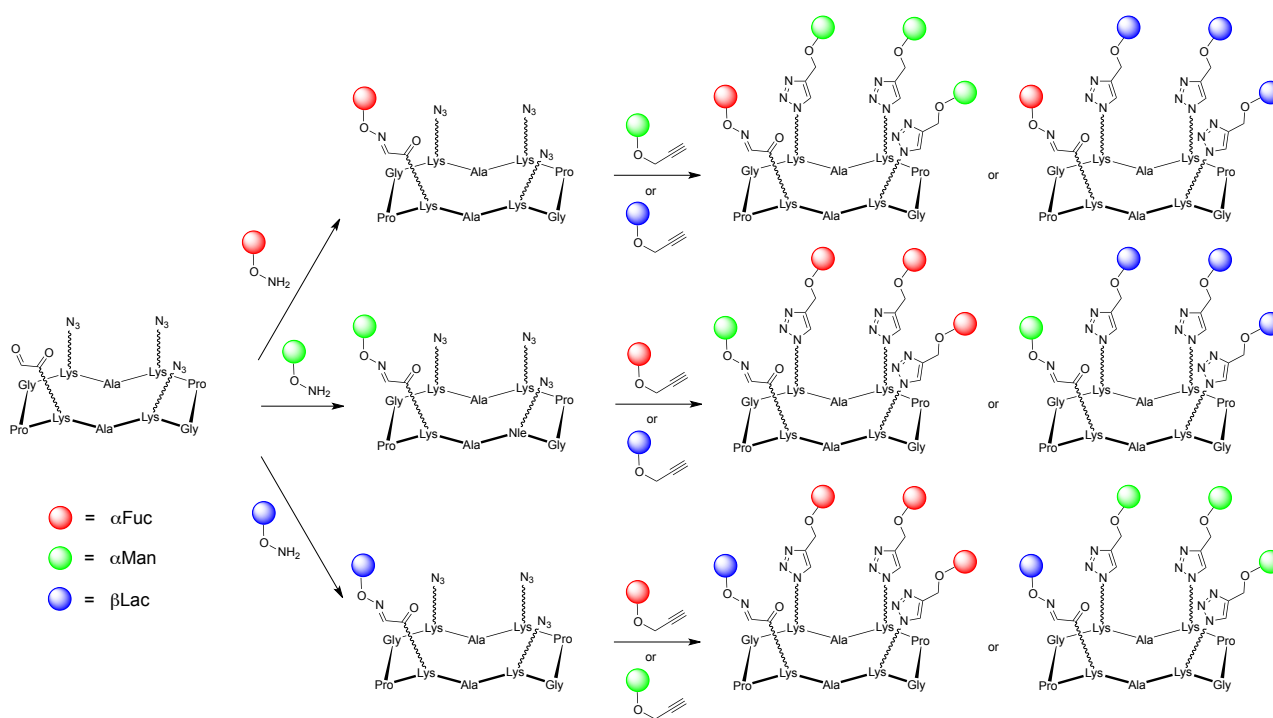


Schéma 67 : Synthèse des hCG en série 3:1

Les rendements obtenus pour ces six hétéroglycoclusters sont présentés dans le *Tableau 10*. Si on compare les données obtenues pour les six composés en série 2 + 2 par rapport aux six composés en série 3 + 1, on s'aperçoit que les rendements sont relativement similaires et supérieurs à 85%, ce qui témoigne de l'efficacité de notre stratégie de synthèse.

Composé	Rendement ^a	MS calculée ^b	MS trouvée ^c	t _R (min) ^d
αMan(ox)/αFuc(trz)	85%	1880,9	1881,1	7,88
αMan(ox)/βLac(trz)	87%	2415,0	2415,4	7,30
αFuc(ox)/αMan(trz)	91%	1912,9	1913,2	7,66
αFuc(ox)/βLac(trz)	90%	2400,0	2399,3	7,46
βLac(ox)/αMan(trz)	89%	2092,0	2091,2	7,46
βLac(ox)/αFuc(trz)	91%	2043,9	2043,1	7,83

Tableau 10 : Récapitulatif des données expérimentales obtenues en série 3:1 a) Les rendements sont déterminés par HPLC ; b) Masse calculée pour (M + H)⁺ ; c) Les masses sont effectuées en ESI en mode positif ; d) Temps de rétention déterminé par HPLC (gradient linéaire de 5 à 100% en B en 20 min)

Contrairement aux hétéro-glycosystèmes tétravalents obtenus par chimie combinatoire au laboratoire, cette nouvelle stratégie permet de réaliser un assemblage contrôlé des différents résidus saccharidiques sur le décapeptide avec de très bons rendements et une excellente pureté. Cette méthodologie semble applicable pour une variété de motifs osidiques sans qu'aucune réelle

différence de réactivité ne soit observée. Nous avons également pu confirmer que la ligation oxime et la cycloaddition de Huisgen sont parfaitement orthogonales et adaptées à la synthèse d'hGC.

III.B. Série 4 + 2

Nous nous sommes ensuite intéressés aux glycosyle thiols qui sont des composés très utilisés en glycoscience^{[297] [298]}. Ce type de composé peut en effet être utilisé pour réaliser des « photos réactions » sur des alcènes (TEC)^[299] ou des condensations sur des résidus chloro-acétyle (TCC)^[300]. Au cours de ce travail nous avons décidé d'étudier si ces deux méthodes peuvent être compatibles car elles présenteraient l'avantage de ne nécessiter qu'un seul type de dérivé sucre.

Pour cela, des cyclodécapeptides portant quatre lysines Alloc sur la face supérieure et deux groupements Chloro-acétyle sur la face inférieure ont été préparés ainsi que les combinaisons inverses.^[301] Nous avons choisi le α -D-Man-SH et le β -D-GlcNAc-SH pour cette étude car leurs synthèses sont bien décrites dans la littérature (Schéma 68).^[302]

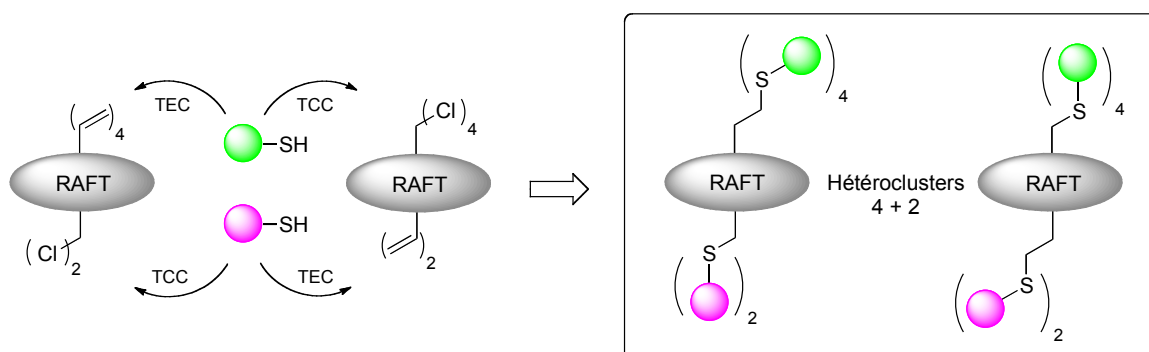


Schéma 68 : Représentation de la stratégie employée pour préparer des hGC en série 4:2

Pour commencer, le RAFT linéaire **210** contenant quatre lysines protégées par des groupements Alloc (**Fmoc-Lys(Alloc)-OH**) et deux autres par des Boc (**Fmoc-Lys(Boc)-OH**) est synthétisé sur support solide en stratégie Fmoc/tBu (Schéma 69). Après clivage de la résine puis cyclisation, les groupements Boc sont déprotégés par acidolyse, puis le cyclodécapeptide **212** est précipité plusieurs fois dans l'éther. Ensuite, la fonction chloro-acétyle est introduite sur les lysines par l'intermédiaire de l'anhydride chloroacétique, dans les conditions décrites précédemment. Finalement la plateforme **213** est obtenue après purification par HPLC semi-préparative (Schéma 69).

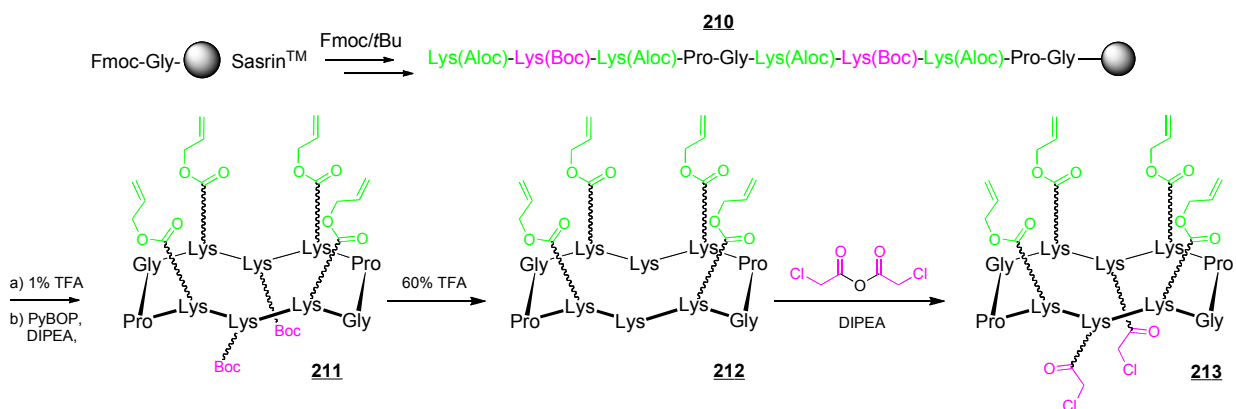


Schéma 69 : Synthèse de la plateforme bi-fonctionnelle portant quatre alcènes et deux groupements chloro-acétyles

Par la suite, nous avons étudié l'ordre dans lequel doivent être réalisées les deux ligations. Dans la *voie A*, la TEC a été réalisée en 1^{er} alors qu'elle a été effectuée en 2^{ème} dans la *voie B*.

- *Voie A (TEC puis TCC)*

La réaction TEC a été effectuée dans un mélange DMF/H₂O (2:1) en présence de DPAP (0,3 équivalent par double liaison) et de α -D-Man-SH **214** (3 équivalents par site) (*Schéma 70*). Après 45 minutes sous irradiation UV ($\lambda = 365$ nm), aucune trace du RAFT **213** de départ n'est observé par HPLC analytique, en revanche l'intermédiaire **215** portant quatre résidus mannoses et deux groupements chloro-acétyles libres a été identifié puis caractérisé par spectroscopie de masse (UPLC-MS). Ceci signifie qu'aucune réaction secondaire ne s'est produite entre le Man-SH et les groupements chloro-acétyles. Cependant, la présence du sucre utilisé en excès pour cette réaction pourrait être problématique lors de l'étape suivante (TCC). Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons directement effectué la TCC sans purification préalable. Ainsi, l'homocluster **215** est dissous dans une solution de DMF contenant du NaH puis un léger excès de β -D-GlcNAc-SH **216** (1,2 équivalents par site) est ajouté (*Schéma 70*).

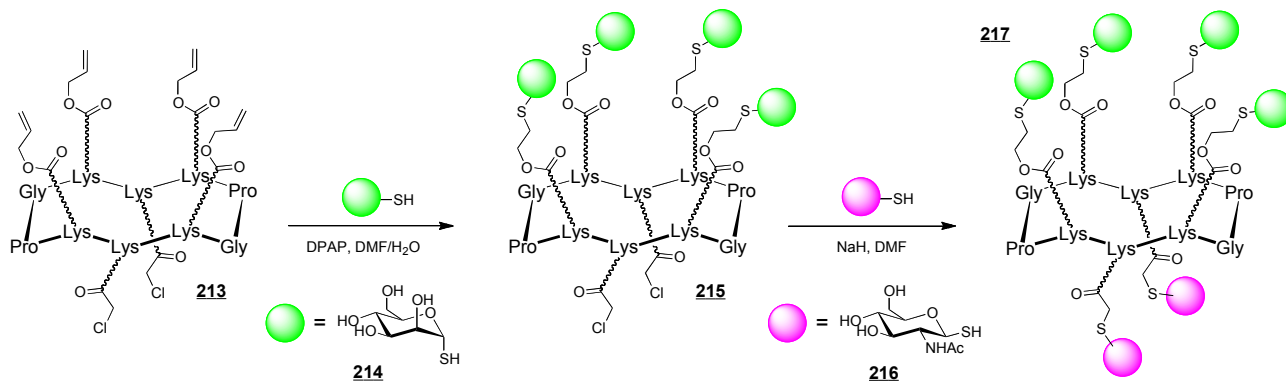


Schéma 70 : Synthèse de l'hGC **217** suivant la procédure *A*

Comme nous l'avions anticipé, un mélange complexe d'hGC est obtenu dans ces conditions, de plus aucun produit ne peut être isolé par HPLC semi-préparative. Avant de réaliser la ligation TCC, il est donc indispensable de purifier l'intermédiaire **215** qui est obtenu avec un rendement de 46% (soit environ 82% par position). La réaction TCC est effectuée avec le dérivé β -D-GlcNAc-SH **216** dans les conditions décrites précédemment. L'hGC **217** portant quatre résidus mannoses et deux GlcNAc est ainsi obtenu avec un rendement de 80%, pour un rendement global de 36%.

- *Voie B (TCC puis TEC)*

Nous avons cherché à modifier l'ordre des réactions TCC et TEC afin de réaliser l'assemblage des résidus osidiques *one-pot*, c'est-à-dire sans purification intermédiaire. En effet, contrairement à la *voie A*, seulement un léger excès de β -D-GlcNAc-SH **216** est nécessaire pour réaliser la TCC, de ce fait l'excès de sucre ne devrait pas interférer avec la réaction suivante. Tout d'abord, la TCC est réalisée comme précédemment, puis le brut réactionnel est neutralisé par ajout de HCl. Le composé **218** est ensuite utilisé tel quel sans purification. Le dérivé α -D-Man-SH **214** est alors conjugué par TEC puis purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir l'hétéroglycocluster **217** avec un rendement de 78% (calculé sur deux étapes) (*Schéma 71*).

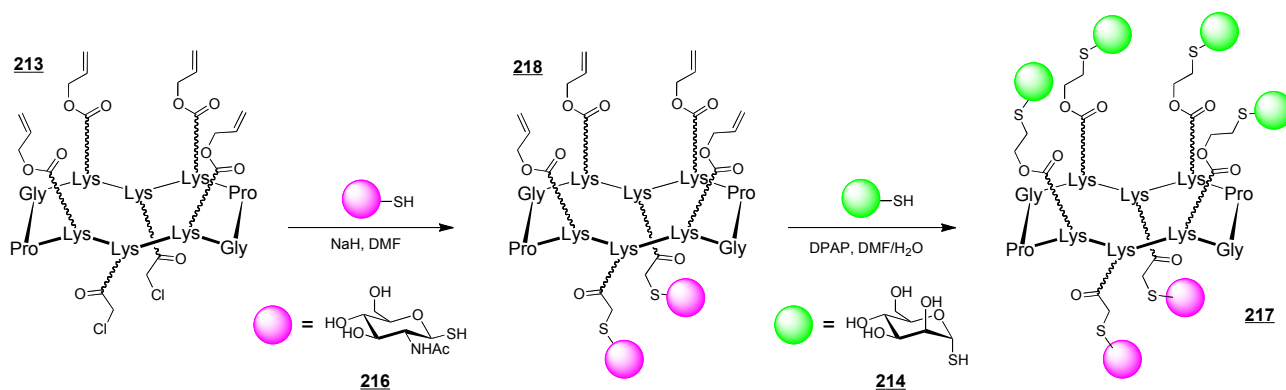


Schéma 71 : Synthèse de l'hGC **217 suivant la procédure *B***

En suivant cette procédure, aucun produit secondaire correspondant à l'addition de β -D-GlcNAc-SH **216** sur un groupement Alloc n'est évidemment observé. En plus d'obtenir **217** avec un meilleur rendement, la stratégie *one-pot* permet également de synthétiser l'hGC plus rapidement et avec une seule purification finale. Pour finir, nous avons montré qu'il est également possible d'utiliser le α -D-Man-SH **214** pour réaliser la TCC et le β -D-GlcNAc-SH **216** pour la TEC. Dans les mêmes conditions, l'hétérocluster **219** a été obtenu avec un rendement quasiment similaire de 80% (*Schéma 72*).

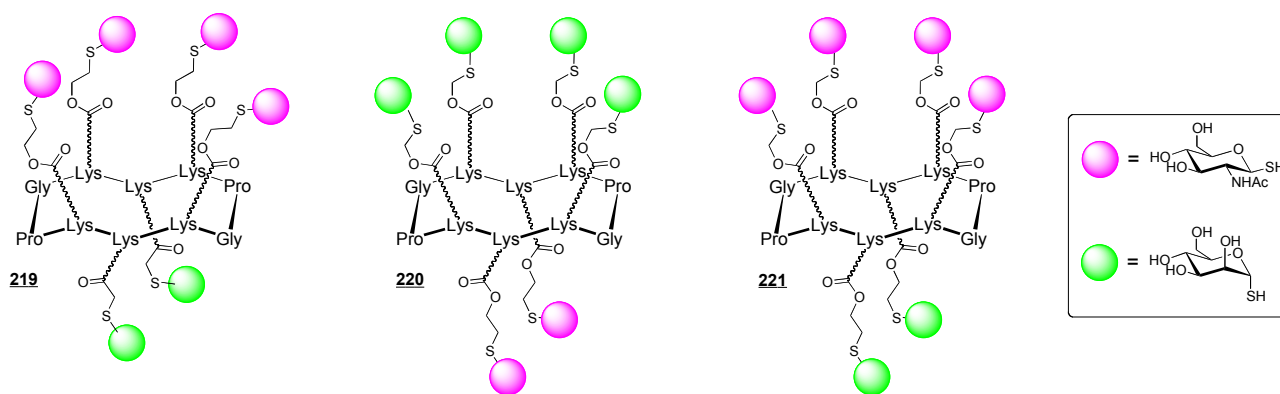


Schéma 72 : Structure des hGC 219, 220 et 221

Pour vérifier l'efficacité et la versatilité de notre stratégie, nous avons réalisé la même étude mais à partir d'un cyclodécapeptide portant les groupements chloro-acétyle sur la face supérieure et deux Aloc sur la face inférieure. En suivant la procédure *one-pot*, le composé 220 portant quatre résidus mannose et deux GlcNAc introduits respectivement par TCC et TEC a été obtenu avec un rendement de 77%. L'hétéroglycocluster 221 portant quatre GlcNAc et deux mannoses a été quant à lui isolé avec un rendement de 54% (Schéma 72). A travers cette étude nous avons démontré que les ligations TEC et TCC sont orthogonales mais qu'une purification intermédiaire est indispensable si la réaction TEC est réalisée en premier. De plus, si ces deux réactions sont utilisées dans un ordre précis (TCC puis TEC), elles peuvent être réalisées selon une procédure *one-pot*.

III.C. Série 4 x 1

Un objectif important de notre travail a été d'augmenter la diversité structurale de nos composés en présentant jusqu'à quatre motifs osidiques différents sur la face supérieure du cyclodécapeptide.^[303] Cette nouvelle série d'hétéroclusters tétravalents sera nommée *4 x 1* dans la suite de ce manuscrit.

Pour réaliser le couplage contrôlé des différents motifs osidiques, nous avons choisi quatre méthodes de ligations chimiosélectives orthogonales : la ligation oxime, la cycloaddition de Huisgen, le couplage thiol-ène et la ligation chloro-acétyle. Ces méthodes ont été sélectionnées sur la base de nos travaux antérieurs et ceux du groupe de Marra et Dondoni qui ont montré que la CuAAC et la TEC étaient également orthogonales. Enfin, en raison du nombre élevé d'acides aminés commerciaux protégés orthogonalement, le système RAFT semble parfaitement adapté pour démontrer la faisabilité de notre stratégie.

- *Fonctionnalisation de la face supérieure du cyclodécapeptide*

Cette approche nécessite au préalable de préparer le cyclodecapeptide **225** (Schéma 73).

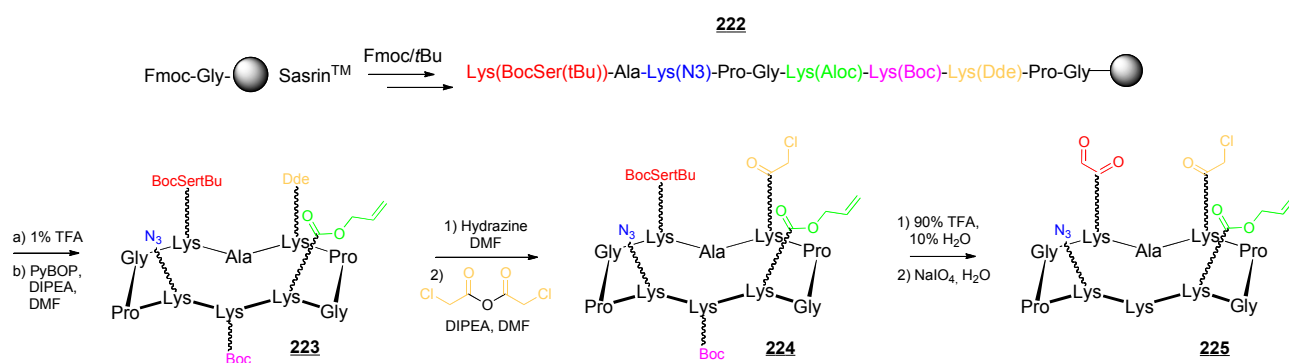


Schéma 73 : Synthèse de la plateforme synthétique **225** portant des fonctions aldéhydes (OL), azotures (CuAAC), alcènes (TEC) et chloro-acétyle (TCC)

Tout d'abord, le peptide linéaire **222** constitué de cinq lysines pré-fonctionnalisées et protégées orthogonalement (Lys(Boc-Ser(tBu)), Lys(N₃), Lys(Aloc), Lys(Dde) et Lys(Boc)) a été synthétisé sur support solide dans les conditions classiques sur la résine Gly-sasrin en stratégie Fmoc/tBu. Après clivage de la résine puis cyclisation, le groupe Dde a été déprotégé par traitement avec de l'hydrazine (solution à 2% dans le DMF) en présence d'alcool allylique (5 équivalents) pour empêcher la réduction de l'alcène par l'hydrazine.^[304] La lysine ainsi libérée a été fonctionnalisée avec de l'anhydride chloroacétique, puis le peptide **224** précipité plusieurs fois dans l'éther (Schéma 73). Le clivage des groupements protecteurs acido-labiles est réalisé par une solution de TFA à 90% dans l'eau, et pour finir, un traitement par du périodate de sodium permet de générer la fonction aldéhyde. Finalement, le RAFT **225** fonctionnalisé par cinq groupes fonctionnels (un aldéhyde glyoxylique, un azoture, un alcène, un chloro-acétyle et une amine) est obtenu avec un rendement de 77% après purification HPLC et caractérisé par MS (Figure 72).

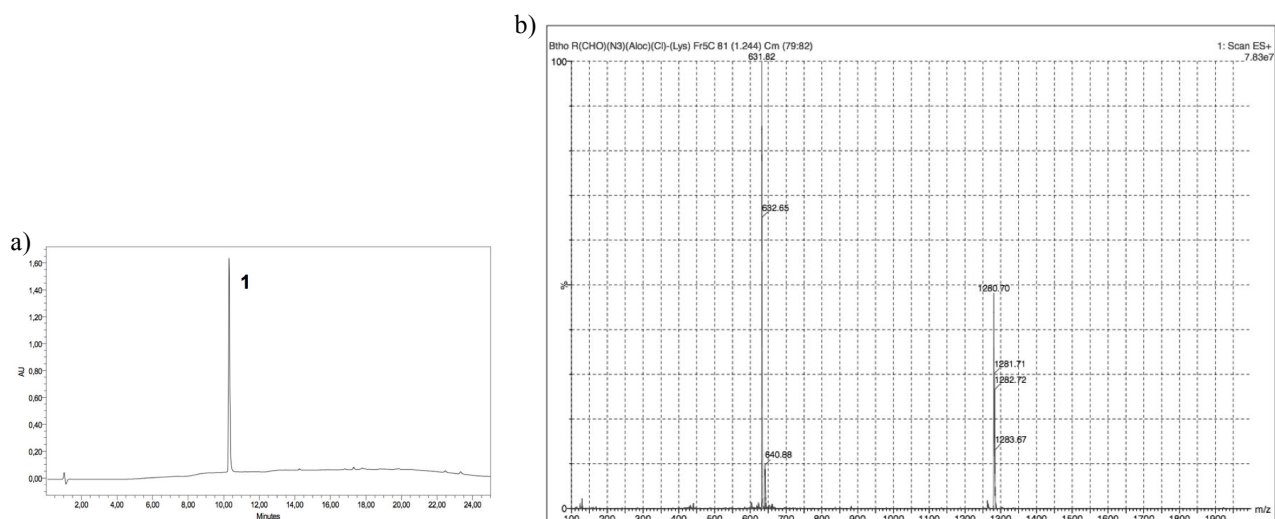


Figure 72 : Caractérisation du composé **225** par a) HPLC et b) ESI-MS

- *Stratégie d'assemblage séquentiel*

Pour déterminer dans quel ordre réaliser chacune de ces quatre ligations, nous avons dans un premier temps étudié la compatibilité chimique de chaque groupement fonctionnel (aldéhyde, azoture, alcène, chloro-acétyle et amine) dans les conditions requises pour chaque couplage. Etant donné que l'aldéhyde glyoxylique est le groupe fonctionnel le plus sensible, nous avons décidé de réaliser la ligation oxime dans un premier temps (*Schéma 74*). Cette réaction a été effectuée en présence de 1,2 équivalent de Glc **226** dans de l'eau contenant 0,1% TFA. Après 30 minutes, l'analyse par HPLC analytique (*Figure 73*) montre une conversion complète de **225** en **227**.

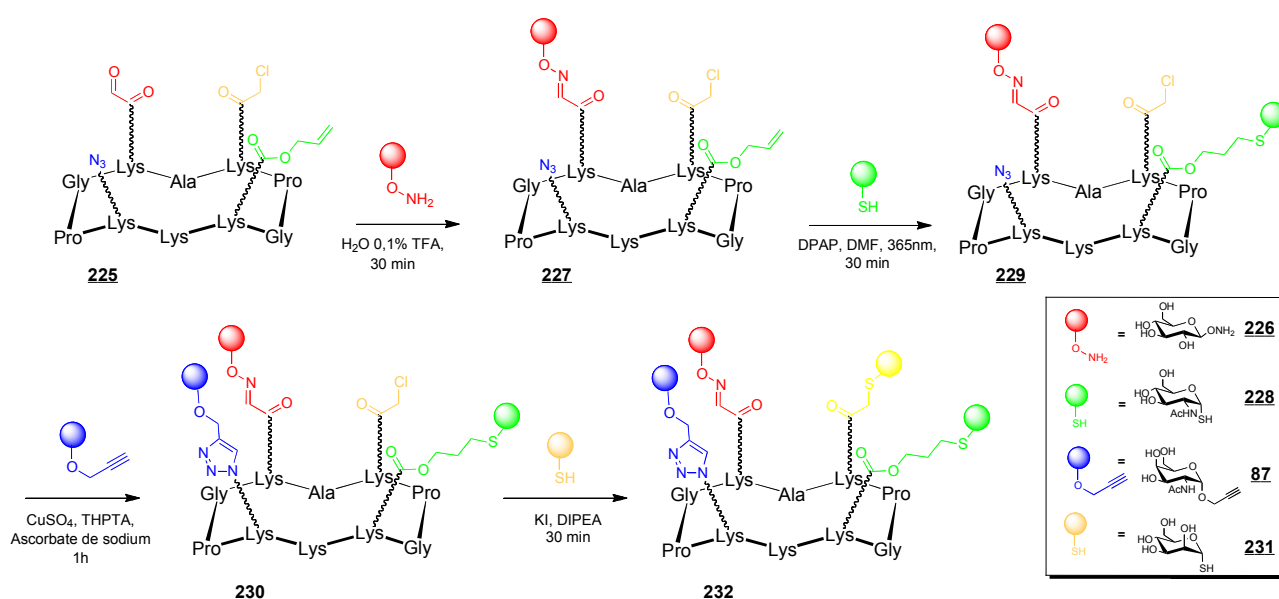


Schéma 74 : Stratégie d'assemblage chimiosélective du composé **232**

Finalement, le composé **229** a été obtenu avec un rendement de 87% après purification par HPLC semi-préparative.

Le choix de l'ordre des réactions suivantes a été plus difficile. Tout d'abord, nous n'avons pas constaté de problème particulier avec la réaction CuAAC, qu'elle que soit le moment où elle a été utilisée. En revanche, contrairement à ce que nous avons montré précédemment, la ligation TEC a dû être réalisée avant la réaction TCC pour obtenir les meilleurs résultats. En effet, même si le couplage du Man-SH **231** réalisé par TCC ne pose pas de problème, le couplage TEC suivant avec le GlcNAc-SH **228** est plus délicat et donne des taux de conversion du produit de départ très faibles (de l'ordre de 20%) même si l'intermédiaire est purifié par HPLC. Ainsi, nous avons déterminé que la séquence réactionnelle optimale consistait à réaliser la TEC, puis la CuAAC et enfin la TCC.

La ligation photo-induite TEC a été réalisée selon les conditions mises au point auparavant. Pour cela, le composé **227** dissous dans un mélange DMF/H₂O a été mis en présence de trois équivalents de GlcNAc-SH **228** et 0,1 équivalent de photoinitiateur (DPAP). La réaction a été laissée sous agitation et irradiation UV ($\lambda = 365$ nm) pendant 30 minutes, puis purifiée par HPLC semi-préparative pour conduire à l'hétéroglycocluster divalent **229** avec un rendement modeste de 67%. Ce rendement relativement faible s'explique par des réactions secondaires qui se produisent entre le dérivé de sucre thiol et le groupement chloroacétyle, comme en témoigne le profil HPLC représenté *Figure 73*. Le taux de conversion de cette réaction secondaire a été estimé entre 5 et 10%.

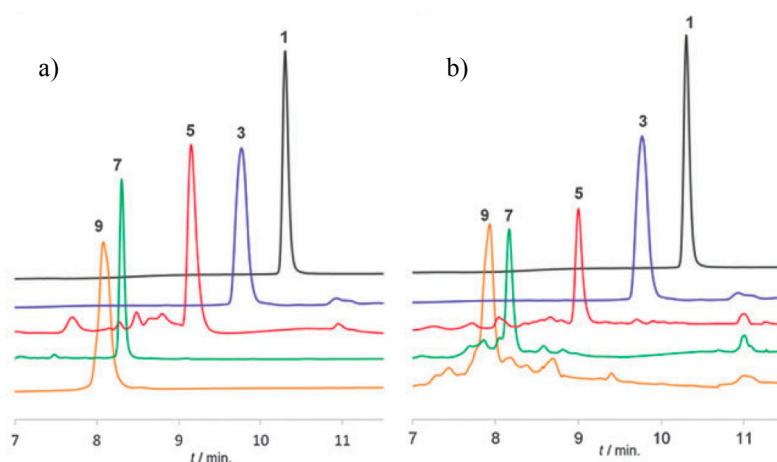


Figure 73 : Suivi HPLC de chaque réaction de couplage OL (bleu), CuAAc (rouge), TEC (vert) et TCC (orange) ; a) Stratégie d'assemblage séquentielle ; b) Stratégie d'assemblage one-pot

La ligation suivante est la cycloaddition de Huisgen, qui a été effectuée en présence de 2,5 équivalents de GalNAc propargylé **87**, de 1 équivalent de CuSO₄, 5 équivalents de THPTA et 7 équivalents d'ascorbate de sodium dans un mélange DMF/Tampon phosphate pH 7,4. Après 1h sous agitation à température ambiante, le profil HPLC (voir profil HPLC *Figure 73*) indique la disparition du composé **229** et l'apparition d'un nouveau signal correspondant au cyclopeptide trivalent **230**. De la résine Chelex[®] a ensuite été ajoutée puis le mélange a été directement purifié par HPLC semi-préparative pour donner le composé **230** avec un rendement isolé de 85%. Pour finir, la ligation TCC a été réalisée avec 3 équivalents de Man-SH **231** en présence de DIPEA (50 équivalents) et de KI (20 équivalents) dans un mélange DMF/H₂O. Finalement, l'hGC tétravalent **232** (*Schéma 74*) a été obtenu après purification avec un rendement de 84%, ce qui correspond à un rendement global de 41% pour les quatre réactions successives. Ce produit a été caractérisé par ESI-MS et HPLC (*Figure 74*).

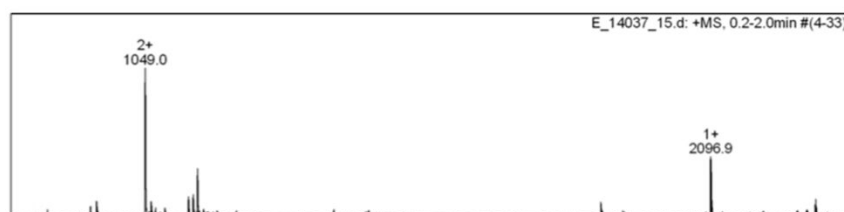


Figure 74 : Spectre ESI-MS du composé **232**

- *Stratégie d'assemblage one-pot*

Alternativement, nous avons réalisé l'assemblage des différents motifs osidiques en utilisant une stratégie de *one-pot séquentiel* pour trois raisons : *i)* limiter les étapes de purification ; *ii)* accélérer le processus d'assemblage (gain de temps) ; *iii)* augmenter si possible le rendement global. Pour pouvoir comparer ces deux approches, chaque réaction a été effectuée dans le même ordre et dans les mêmes conditions. Le pH a cependant dû être ajusté entre chaque couplage, soit par ajout de base, de solvant ou de tampon. Ainsi, après le couplage oxime, le pH est ajusté à 4 par ajout de DMF puis la ligation TEC est réalisée. Une fois le couplage terminé, le pH est augmenté à 7 par ajout de tampon phosphate pour effectuer la cycloaddition. Enfin, le pH est ajusté à 12 par ajout de DIPEA pour effectuer la ligation TCC. Les profils HPLC obtenus montrent que les couplages se sont déroulés efficacement malgré l'accumulation de réactif à chaque étape qui complique légèrement l'analyse (Figure 73). Il est important de noter que l'hétérocluster tétravalent **232** (Schéma 74) a été obtenu en seulement 3 heures en suivant ce protocole. Encore plus intéressant, le composé tétravalent **232** a été obtenu avec un rendement de 47% après une seule purification (contre 41% en purifiant à chaque étape), ce qui indique clairement que l'assemblage contrôlé des différents résidus osidiques selon un processus *one-pot séquentiel* semble plus approprié. Il faut noter que cette méthodologie impliquant quatre ligations différentes est sans précédent puisque seules des approches de triple ligations avaient été rapportées dans la littérature.

- *Couplage d'une biotine et d'une fluorescéine par couplage amide*

Une fois la synthèse d'hétérocluster tétravalent au point, nous avons évalué la conjugaison de diverses structures d'intérêt biologique par l'intermédiaire de la lysine disponible sur la face inférieure du cyclodecapeptide. Nous avons dans un premier temps couplé des agents de marquage tels que la fluorescéine et la biotine par l'intermédiaire de la fluorescéine isothiocyanate **233** et de l'ester activé biotinylé **234**. Après 30 minutes sous agitation à température ambiante dans le DMF puis purification, les deux glycoconjugués **235** et **236** sont obtenus avec des rendements de 90% et 85% respectivement (Schéma 75).

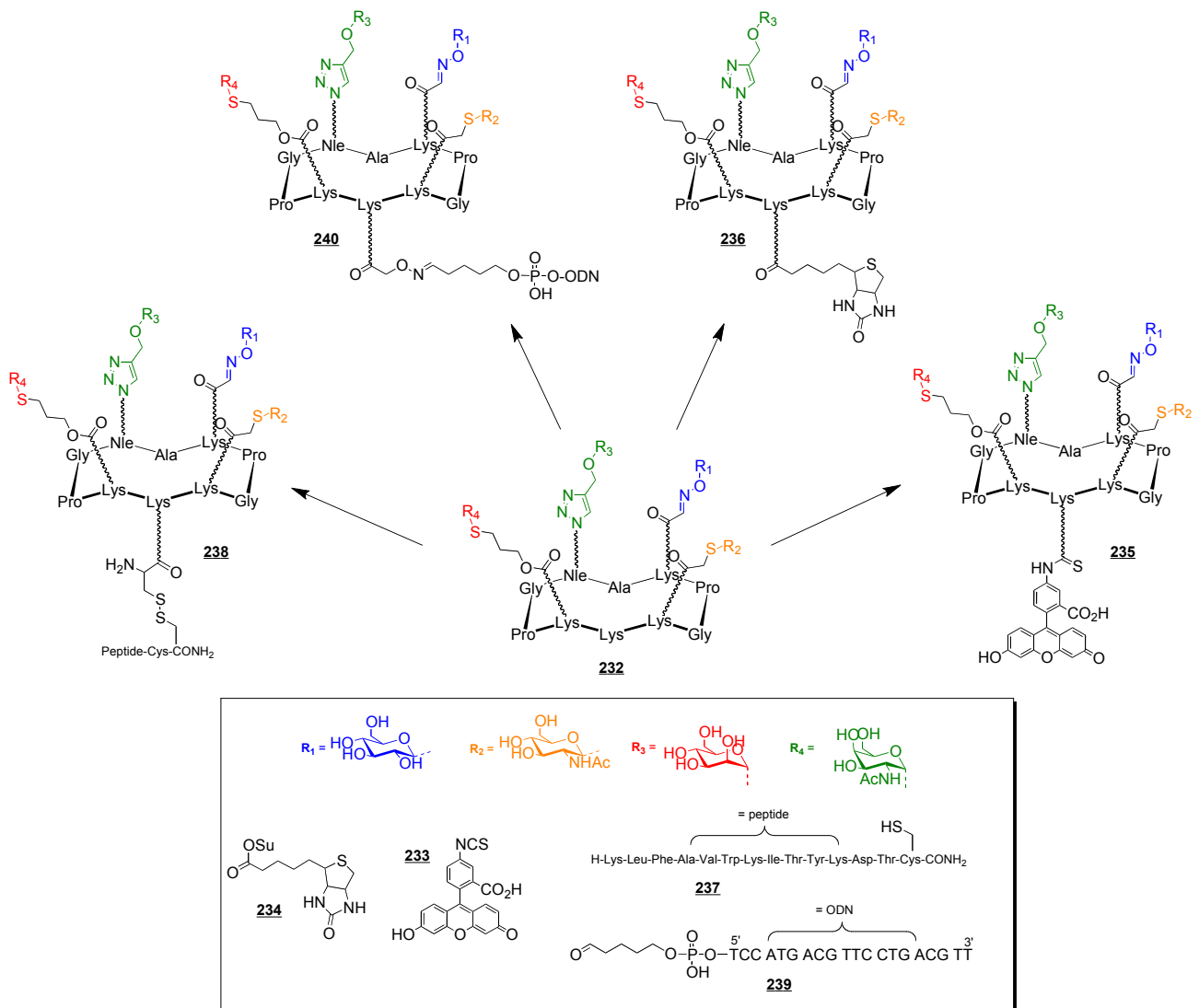


Schéma 75 : Conjugaison de l'hGC 232 avec une biotine 234, une fluorescéine 233, le peptide PV 237 et l'oligonucléotide CpG 239

- *Couplage d'un peptide immunostimulant par pont disulfure*

Cette méthode de synthèse étant dédiée à la préparation de vaccins antitumoraux, nous avons étudié la possibilité d'incorporer le peptide du poliovirus PV-1 (KLF^{AV}WKITYKDT) 237 sur la face inférieure. Pour cela, nous avons choisi un fragment de peptide antigénique issu de la protéine poliovirus. Nous avons démontré au *Chapitre II* que des peptides portant une cystéine en *N*-terminal pouvaient aisément être attachés sur un cyclodécapeptide par formation du pont disulfure. Cette stratégie requiert au préalable l'introduction d'un résidu cystéine (activé par groupement N^Pys) sur la lysine libre de l'hétérocluster tétravalent 232 (*Schéma 75*). La conjugaison avec le peptide est ensuite effectuée dans un mélange DMF / tampon AcONa (pH 5). Après 1 heure, le suivi par HPLC et l'analyse par ESI-MS (*Figure 75*) indiquent que la réaction est complète. Le mélange réactionnel

est alors purifié pour conduire à l'hétéroglycoconjugué **238** avec un rendement isolé de 85% (Schéma 74).

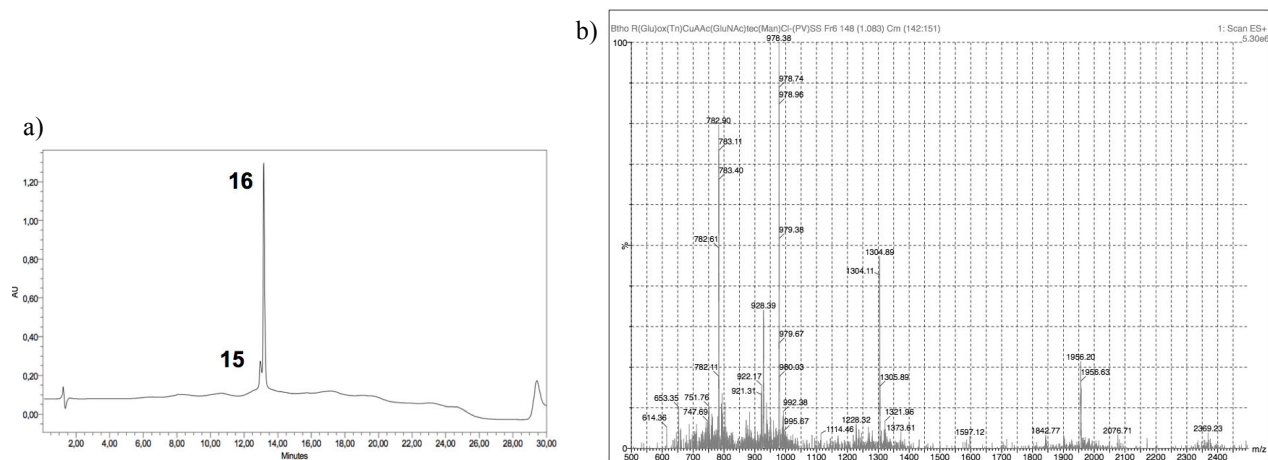
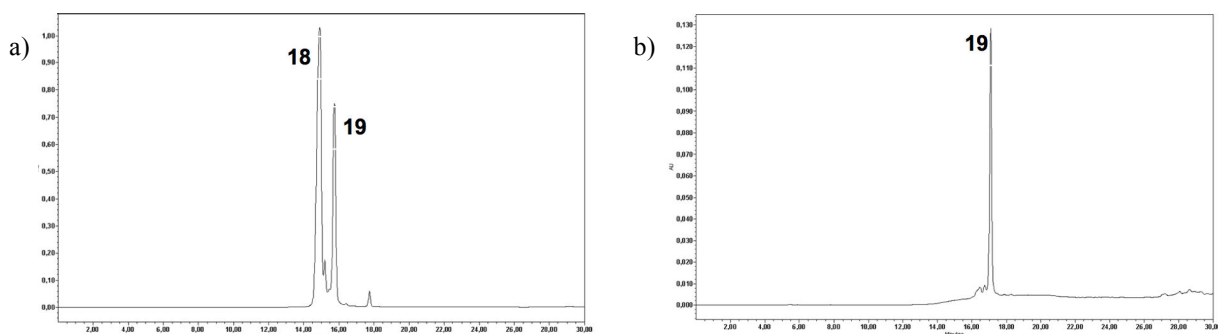


Figure 75 : a) Suivi HPLC de la réaction de conjugaison avec le peptide PV-1 ; b) Spectre ESI-MS du composé **238**

- *Couplage d'un brin d'ADN par ligation oxime*

Finalement, nous avons étudié la possibilité d'utiliser à nouveau la ligation oxime pour évaluer la modularité de cette approche. Pour cela, le linker oxyamine **142** est facilement introduit par l'intermédiaire de son ester activé sur le composé **232**, comme décrit précédemment (voir *Chapitre II*), puis l'oxyamine est libérée par action du TFA (solution à 60% dans l'eau). Ensuite, le cyclodecapeptide contenant l'oxyamine est conjugué au dérivé d'oligodéoxynucléotide CpG **239**, portant un aldéhyde sur son extrémité 5' préparé au laboratoire par Nicolas Spinelli.^[305] Le CpG étant un agoniste du récepteur TLR9, il est souvent utilisé comme adjuvant lors d'immunisation. Son couplage covalent dans un vaccin pourrait donc lui procurer des propriétés auto-adjuvantes. La réaction est réalisée à température ambiante dans un tampon acétate d'ammonium. Après 2 heures, le profil HPLC analytique (HPLC voir *Figure 76a*) et son analyse par MS (MALDI-TOF voir *Figure 76c*) indiquent que la réaction est complète. Le mélange est alors purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir le bioconjugué **240** (HPLC voir *Figure 76b*) avec un rendement de 65% (Schéma 75).



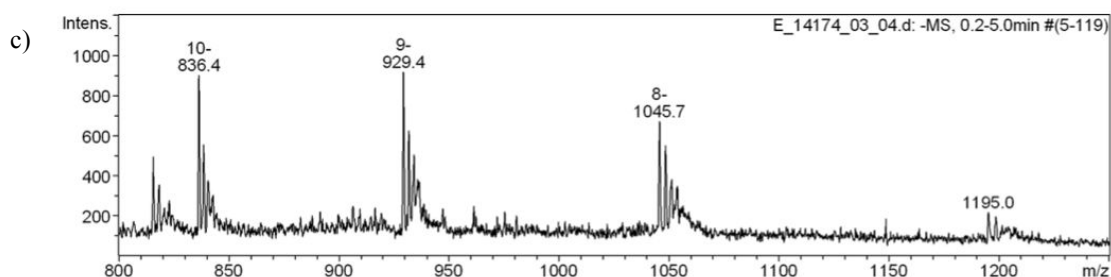


Figure 76 : a) Suivi HPLC de la réaction de conjugaison avec l'oligonucléotide CpG ; b) Profil HPLC du composé **240** après purification ; c) Spectre ESI-MS du composé **240**

Cette stratégie permet donc de réaliser l'assemblage successif de cinq biomolécules sur un même châssis cyclique, en utilisant cinq méthodes de ligations chimiosélectives orthogonales : la ligation oxime (OL), la cycloaddition de Huisgen (CuAAC), la thiol-ène (TEC), la ligation chloro-acétyle (TCC) et le couplage amide ou la formation de pont disulfure. Cette stratégie donne un accès rapide à des molécules possédant une forte diversité structurale, puisque jusqu'à quatre sucres différents peuvent être introduits sur la face supérieure du châssis RAFT, alors que la face inférieure peut être facilement fonctionnalisée par des peptides, des oligonucléotides ou des agents de marquage.

IV. Structures de haute densité

1. Série 8 + 8

Encouragé par ces résultats et afin d'obtenir des structures hautement glycosylées par des TACA différents, nous avons décidé de développer des méthodes permettant cette fois d'augmenter le degré de multivalence de nos hGC. Notre objectif était de synthétiser des hGC hexadécavalents décorés avec 8 copies d'un résidu osidique et 8 d'un autre. La stratégie choisie a consisté à introduire successivement sur un châssis central deux types de RAFT portant des fonctions azotures (en rouge) ou des sérines (en bleu) (Schéma 76).

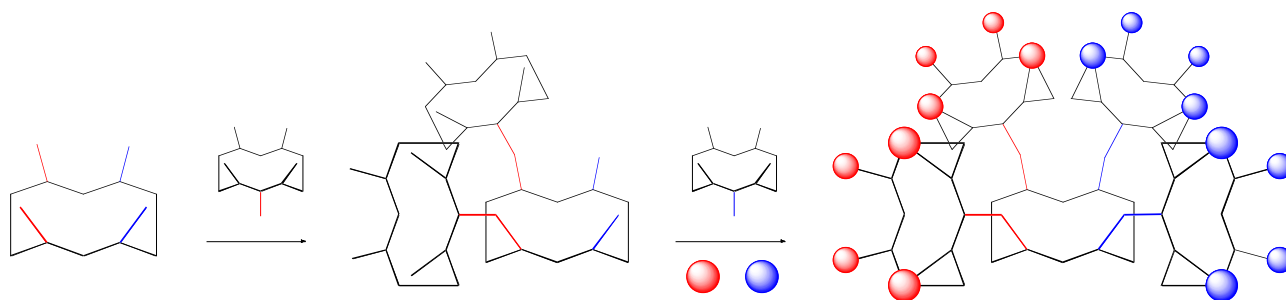


Schéma 76 : Représentation schématique de la stratégie employée pour préparer des hGC en série 8 + 8

Cette nouvelle série de composés nommés $\delta + \delta$ sera ensuite assemblée en utilisant la ligation oxime et la cycloaddition de Huisgen, puisque nous avons démontré précédemment que ces méthodes de ligations chimiosélectives étaient parfaitement orthogonales.

- *Préparation de la plateforme synthétique*

Dans un premier temps, nous avons préparé un châssis hexadécavalent portant 8 aldéhydes et 8 azotures. Pour cela, un RAFT linéaire **241** contenant deux building blocks **Lys(Boc-Ser(tBu))**, deux **Lys(Aloc)** et une **Lys(Boc)** a été synthétisé sur support solide en stratégie Fmoc/tBu sur résine Gly-sasrin (*Schéma 77*). Après clivage de la résine et cyclisation du peptide linéaire, le cyclodécapeptide **242** portant sur la face supérieure deux **Lys(Boc-Ser(tBu))** et deux **Lys(Aloc)** a été obtenu. Le RAFT **243** portant deux lysines libres a été préparé après déprotection des groupements Aloc en présence de Pd(0). Cela va permettre l'introduction du linker oxyamine par l'intermédiaire de l'ester activé **142**, pour obtenir le peptide cyclique **244** après clivage des groupes protecteurs acidolabiles (*Schéma 77*). A ce stade, le cyclopeptide **244** possède trois points d'adressage régiosélectif : i) des oxyamines ; ii) des résidus sérines ; iii) une lysine libre.

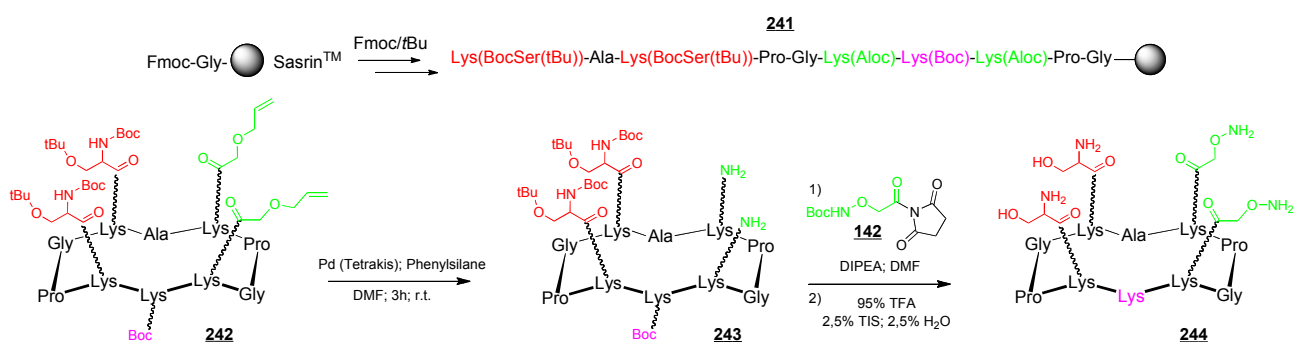


Schéma 77 : Synthèse de la plateforme centrale **244**

La stratégie envisagée nécessite d'abord d'introduire les 8 fonctions azotures sur le RAFT central **244**. Pour cela, le cyclopeptide **248** portant quatre fonctions azoture dans le domaine supérieur et un aldéhyde dans le domaine inférieur a été préparé. Premièrement, le peptide linéaire **245** portant quatre **Lys(N₃)** et une **Lys(Boc-Ser(tBu))** a été synthétisé par SPPS, puis clivé de la résine et cyclisé pour obtenir le peptide cyclique **246**. Après déprotection des Boc et des tBu, le cyclodécapeptide **247** a été engagé dans une réaction de coupure oxydante avec du périodate de sodium. Finalement, le châssis **248** a été obtenu après purification par HPLC semi-préparative (*Schéma 78*).

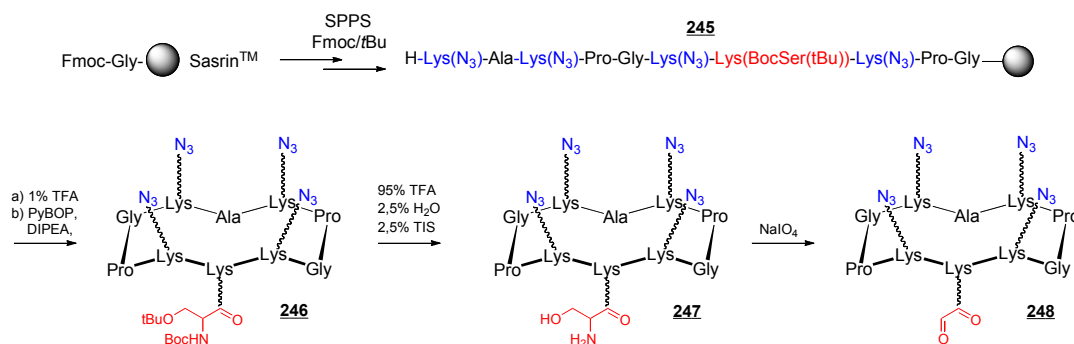


Schéma 78 : Synthèse du châssis bi-fonctionnelle 248

Ce même châssis 248 a ensuite été conjugué sur les oxyamines du RAFT central 244 par couplage oxime dans un mélange H₂O/acétonitrile à 37°C (*Schéma 79*). L'analyse par UPLC-MS et HPLC (*Figure 77*) confirme que la plateforme contient bien 8 azotures et deux résidus sérines, le composé 249 est alors isolé par HPLC semi-préparative avec un rendement de 93%.

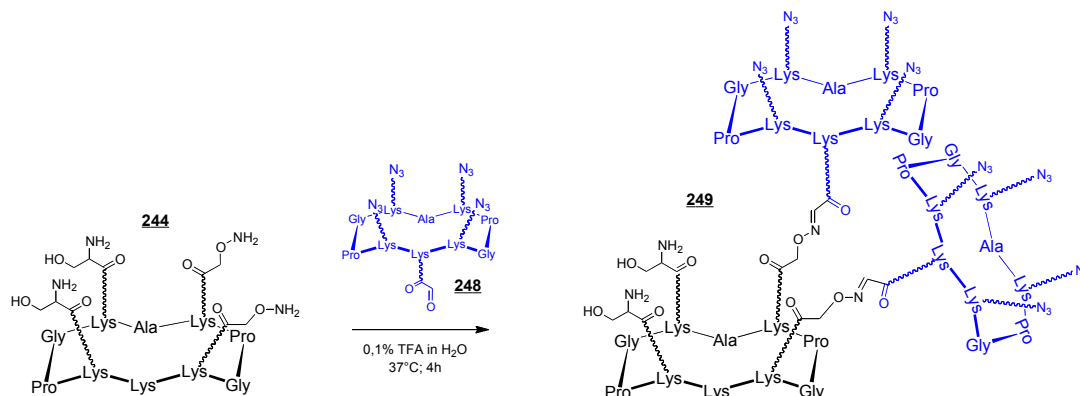


Schéma 79 : Synthèse du composé 249 par couplage oxime entre 244 et 248

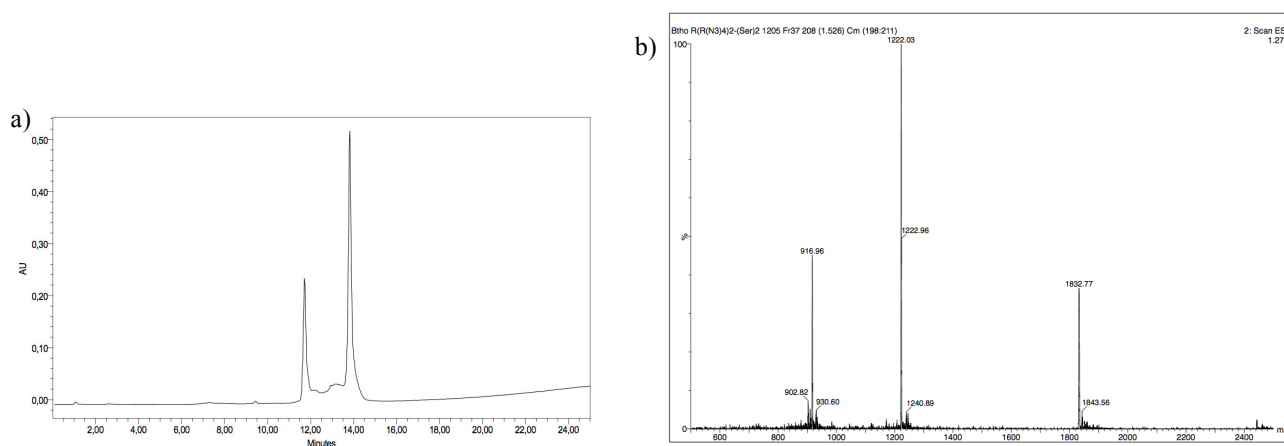


Figure 77 : a) Suivi HPLC de la réaction de couplage oxime entre 244 et 248 ; b) Spectre ESI-MS du composé 249

Par la suite, les deux sérines restantes sont transformées en deux aldéhydes par action du périodate de sodium pour obtenir après purification le châssis fonctionnalisé 250 avec un rendement isolé de

86%. Un couplage oxime dans les conditions classiques entre le composé **250** portant les aldéhydes nouvellement formées et le RAFT **144** (*Schéma 20*) présentant sur sa face supérieure quatre sérines et sur la face inférieure un bras oxyamine conduit au châssis RR **251** portant 8 azotures et 8 sérines (voir ESI-MS et HPLC *Figure 78*).

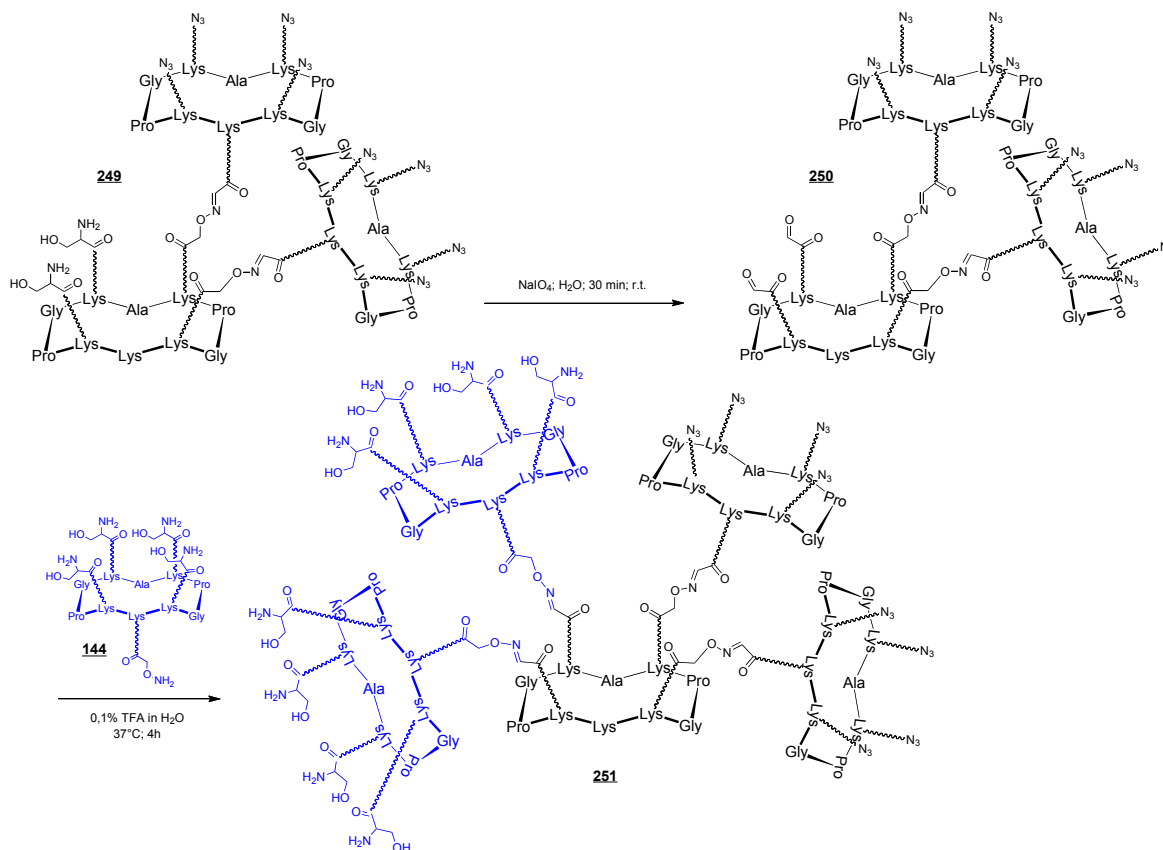


Schéma 80 : Synthèse du composé **251**

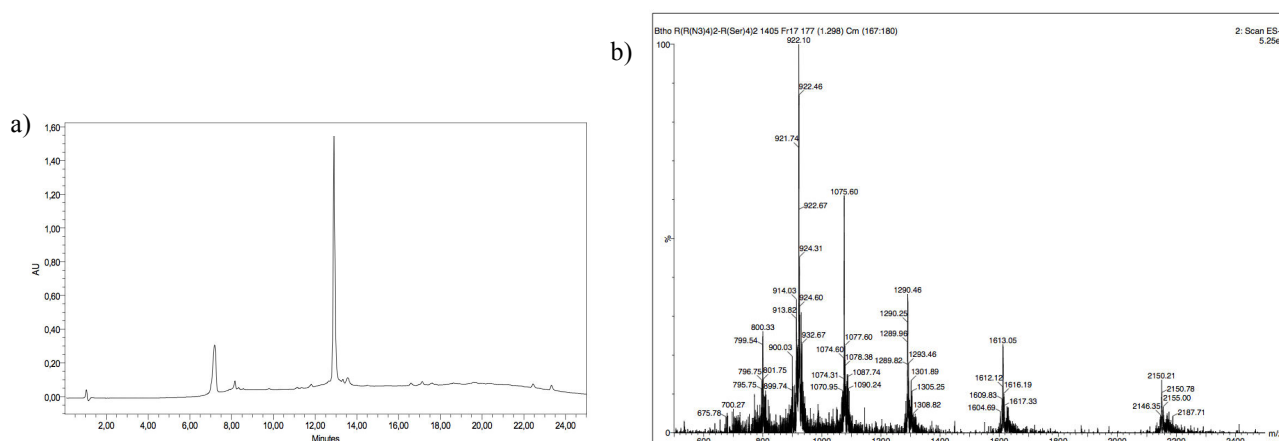


Figure 78 : a) Suivi HPLC de la réaction de couplage oxime entre **250** et **144** ; b) Spectre ESI-MS du composé **251**

Enfin, les résidus sérines vont être traités de nouveau avec du périodate de sodium pour donner après purification la plateforme synthétique **252** (*Schéma 81*). Le châssis portant 8 azotures pour la

CuAAC et 8 aldéhydes pour la OL a été isolé avec un rendement de 83% (sur deux étapes) et avec une excellente pureté, comme en témoignent le profil HPLC et le spectre de masse (*Figure 79*).

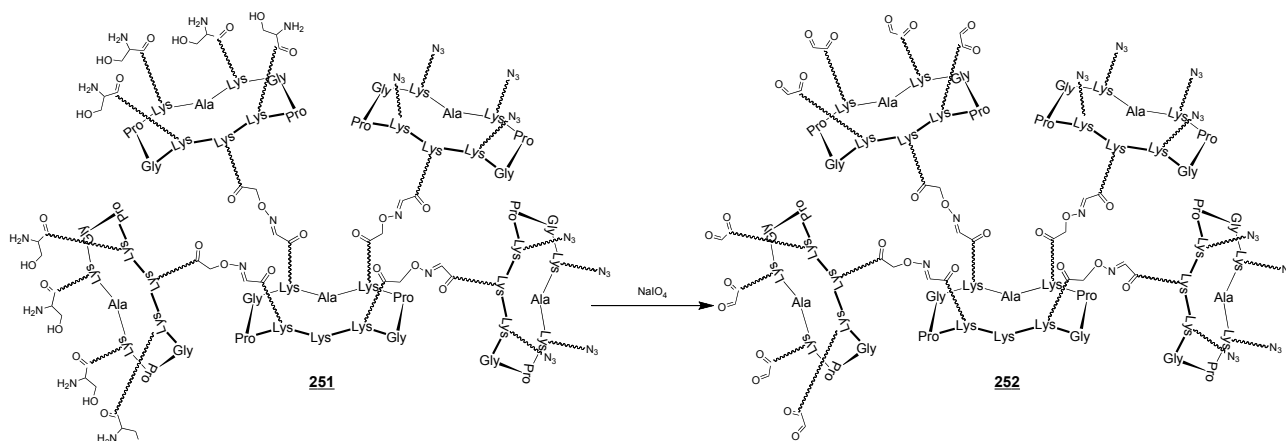


Schéma 81 : Synthèse de la plateforme bi-fonctionnelle multivalente 252

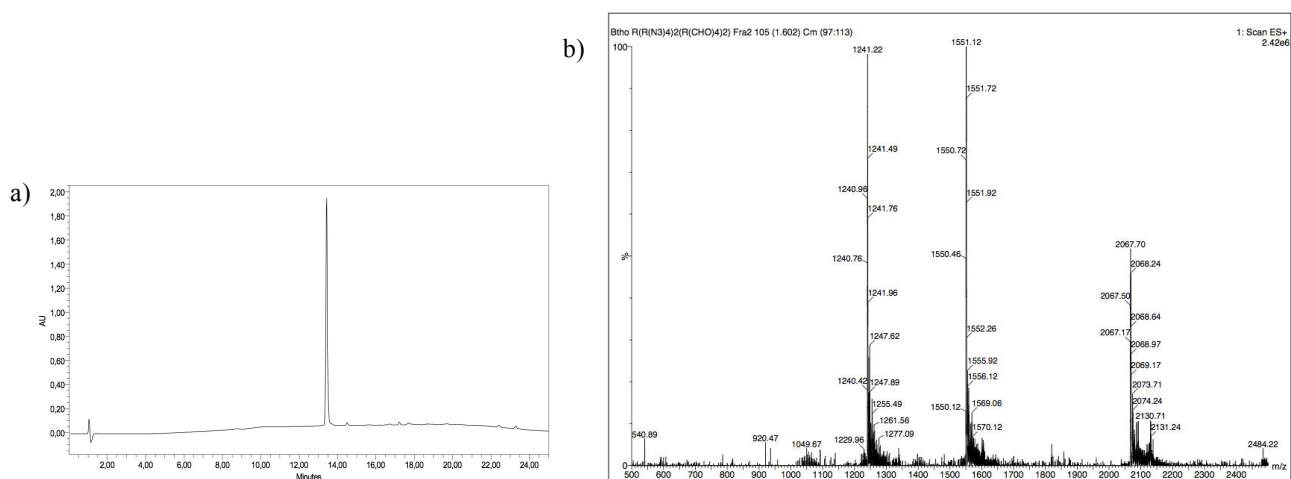


Figure 79 : a) Suivi HPLC de la réaction de coupure oxydante; b) Spectre ESI-MS du composé 252

Ce composé est prêt pour l'assemblage des motifs osidiques puis la fonctionnalisation de la face inférieure par des peptides immunostimulants.

- *Conjugaison des sucres*

Encouragé par les propriétés d'inhibition de nos homoclusters hexadécavalents décrits au *Chapitre II*, nous avons préparé des hGC $\delta + \delta$ afin d'essayer de mettre en évidence des « effets hétéroclusters » avec des lectines. En effet, il est désormais connu que la présence de sites d'interaction « secondaires » à proximité du site de liaison principal peut être exploitée pour interagir simultanément avec différents sucres d'une même molécule. Le type de composés obtenus au cours de notre travail pourraient fournir des informations intéressantes pour comprendre ces interactions secondaires et les exploiter afin d'accéder à des ligands sélectifs. Nous avons dans un

premier temps choisi du Gal, du Fuc et du Man comme modèle simple pour étudier leurs propriétés vis-à-vis de lectines, notamment celles de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, cette bactérie produit deux lectines solubles : LecA spécifique du D-Gal et LecB spécifique du L-Fuc (dont nous avons parlé au *Chapitre II*) et dans une moindre mesure du D-Man. Dans un premier temps, l'hGC possédant 8 α -Fuc et 8 β -Gal introduits respectivement par OL et par CuAAC a été synthétisé. Pour cela la plateforme synthétique **252** portant 8 aldéhydes a été engagée dans un couplage oxime avec 1,5 équivalent par site du fucose oxyamine (*Schéma 82*).

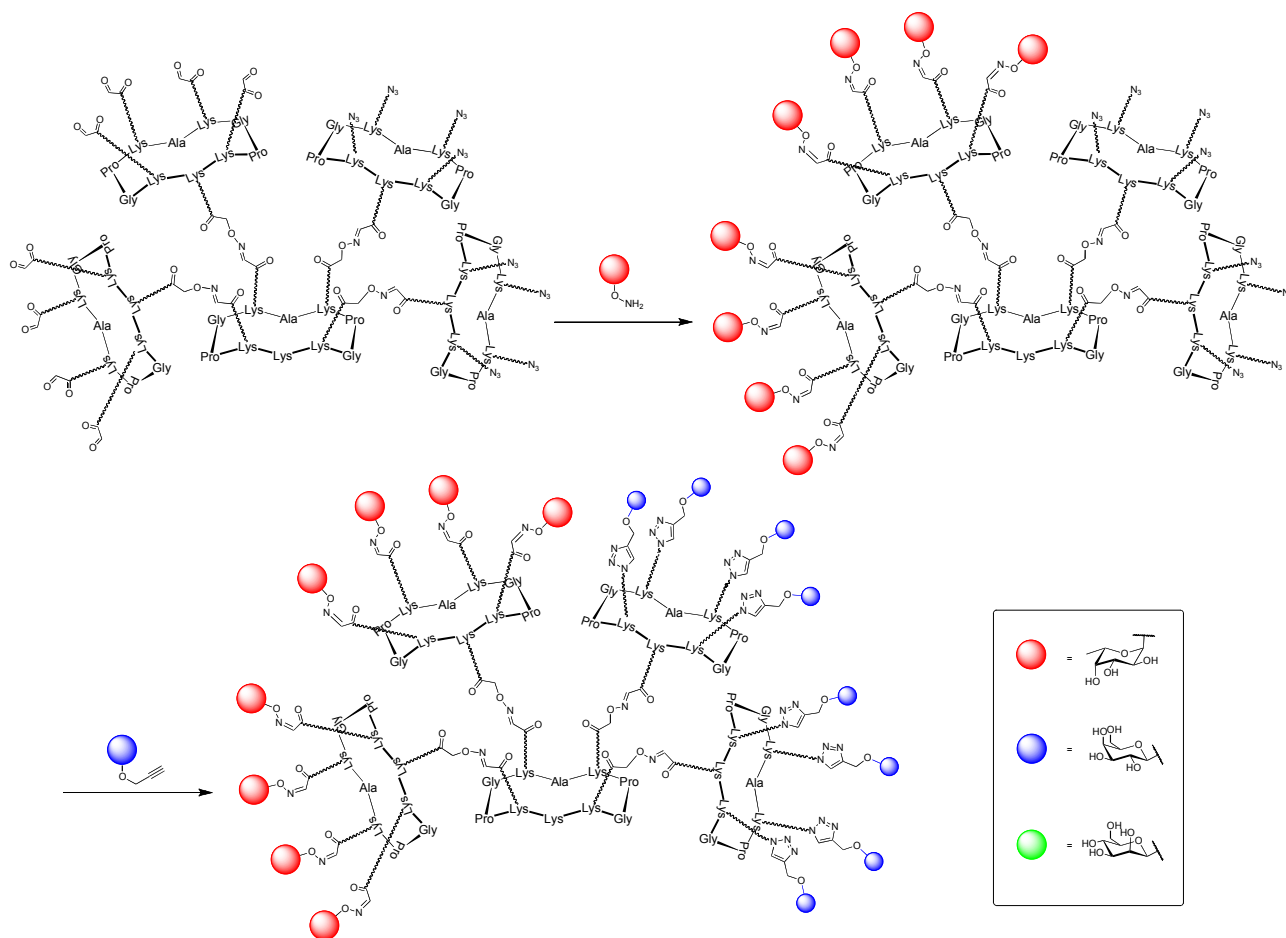


Schéma 82 : Assemblage chimiosélectif des dérivés oxyaminés Fuc, Gal et Man

Après 30 minutes à 37°C dans un mélange H₂O/TFA (0,1%), le suivi de la réaction par HPLC analytique indique que le couplage est complet, de l'acétone a alors été ajouté au milieu réactionnel pour piéger l'excès d'oxyamine.

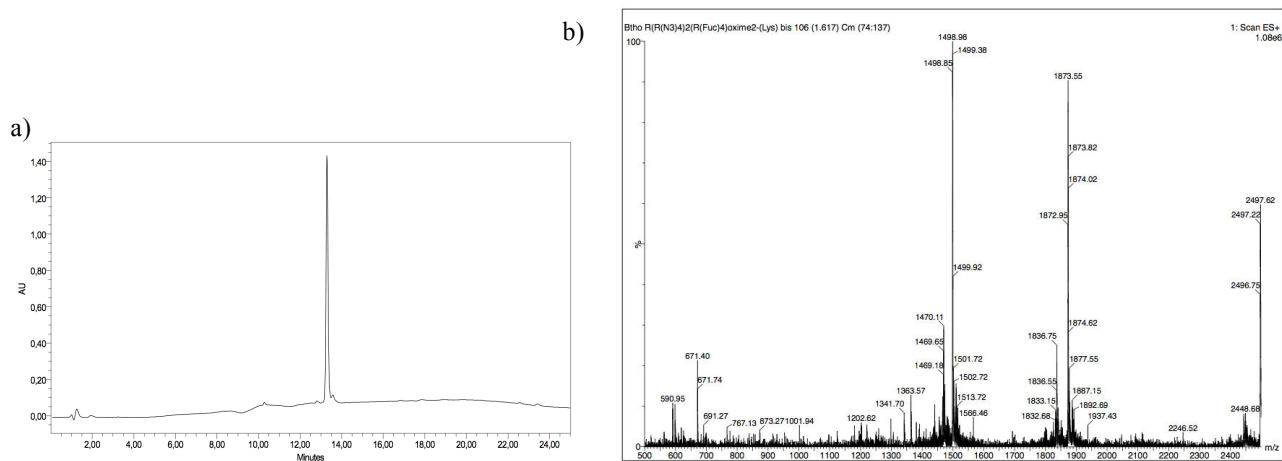


Figure 80 : a) Suivi HPLC de la réaction de couplage oxime entre **252** et un dérivé Fuc ; b) Spectre ESI-MS du composé **253**

Ensuite pour réaliser la cycloaddition de Huisgen, le résidu osidique portant la fonction alcyne dissous dans du DMF préalablement dégazé a été ajouté au châssis RR portant les 8 azotures. Une solution tampon (PBS pH 7,4) contenant du CuSO₄ (8 équivalents) et du THPTA (32 équivalents) et une autre contenant de l'ascorbate de sodium (40 équivalents) ont été préparées et soigneusement dégazées. La solution de CuSO₄/THPTA puis celle d'ascorbate de sodium ont été ajoutées successivement au milieu réactionnel et la réaction est ensuite laissée sous agitation à température ambiante sous atmosphère inerte (*Schéma 82*). Après 3 heures, la réaction est contrôlée par HPLC analytique et de la résine Chelex[®] a été ajoutée au milieu réactionnel pour éliminer le cuivre, puis le mélange est purifié par HPLC semi-préparative (*Schéma 82*).

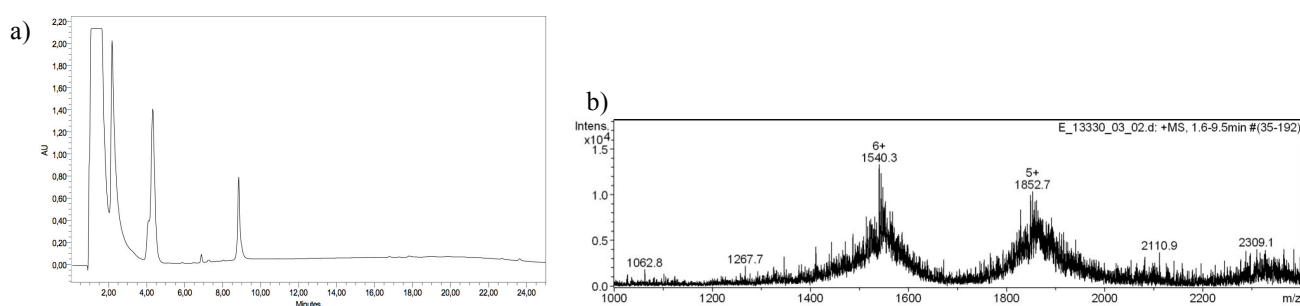


Figure 81 : a) Suivi HPLC de la réaction de cycloaddition entre **253** et le dérivé propargylé Gal ; b) Spectre ESI-MS du composé **8-αFuc(ox)/8-βGal(trz)**

Finalement, l'hétéroglycocluster portant 8 Fuc et 8 Gal a été isolé avec un rendement de 81% calculé sur deux étapes. Les composés partiellement glycosylés **253** et **254** portant respectivement 8 Fuc / 8 azotures ou 8 Gal / 8 sérines ont ensuite été synthétisées en suivant la même procédure. Ces derniers composés seront utilisés comme contrôle pour les tests biologiques (*Schéma 83*).

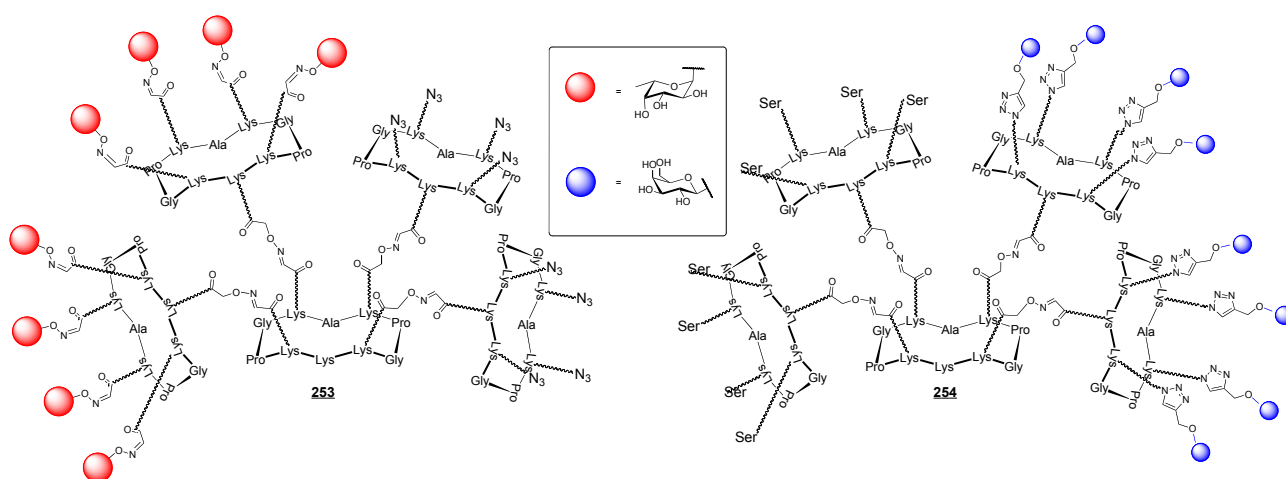


Schéma 83 : Structure des composés partiellement glycosylés 253 et 254

En utilisant cette approche, nous avons complété notre série d'hGC hexadécavalents pour réaliser des tests d'affinité des lectines LecA et LecB par ITC en collaboration avec l'équipe d'A. Imberty du CERMAV de Grenoble. Nous avons ainsi préparé le composé portant 8 Fuc lié par triazole et 8 Gal lié par oxime afin de déterminer si les liens éther d'oxime ou triazole peuvent influencer l'interaction du ligand avec son récepteur. Ensuite, sachant que la lectine LecB possède une forte affinité pour le Fuc mais également, en plus faible proportion pour le Man, nous avons préparé des hGC 8 Fuc / 8 Man et 8 Man / 8 Gal pour étudier l'effet potentiel d'une association Fuc/Man. Les rendements et les temps de rétentions HPLC de toutes ces molécules sont regroupés dans le *Tableau 11*.

	Rendement	Temps de rétention (min)
8-αFuc/8-βGal	81%	8,7
8-βGal/8-αFuc	77%	8,6
8-αFuc/8-αMan	84%	9,1
8-αMan/8-βGal	76%	9,3
8-αFuc/8-N₃	91%	12,3
8-Ser/8-βGal	79%	8,4

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des différents hétéroglycoclusters en série 8 + 8 synthétisés

Ces tests biologiques sont actuellement en cours.

IV.A. Série 4 x 4

La suite de notre travail a consisté à augmenter la diversité structurale de nos systèmes hexadécavalents. Ainsi, une nouvelle série de composé nommée 4 x 4 et présentant quatre copies de quatre motifs osidiques différents sur un même châssis hexadécavalent a été développée au laboratoire. Alors que chaque homo- et hétérocluster décrit jusqu'à présent sont synthétisés en suivant une stratégie divergente, pour réaliser le type de construction envisagée nous proposons d'utiliser une stratégie convergente.

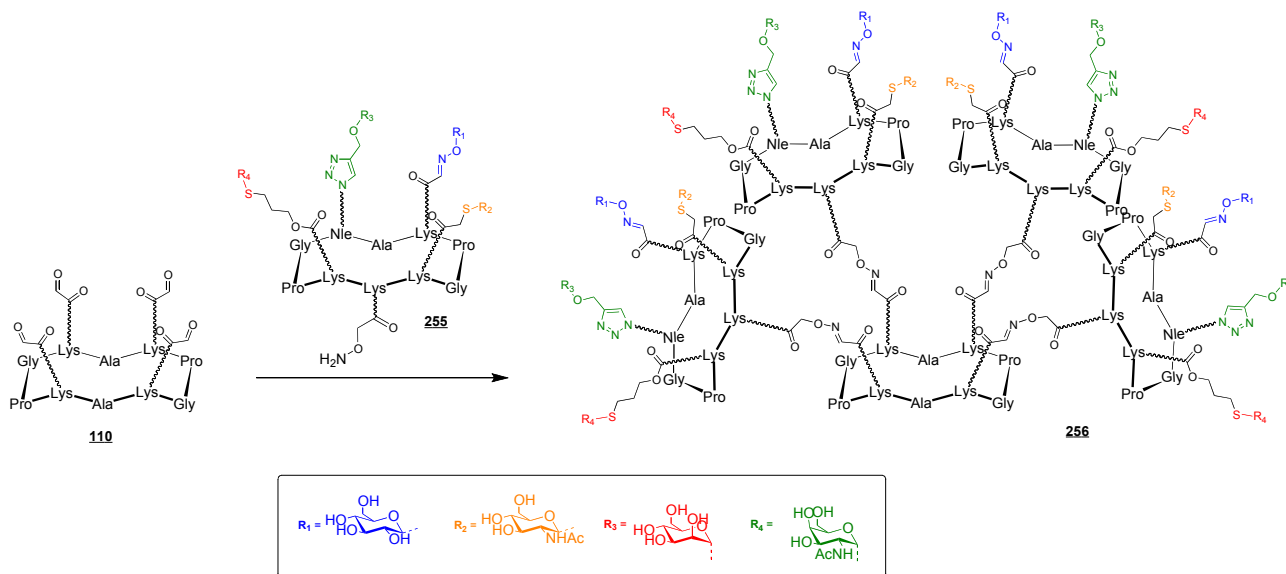


Schéma 84 : Synthèse convergente de l'hétéroglycocluster 255 en série 4 x 4

Pour cela, l'hGC tétra-valent **232** en série 4 x 1 portant quatre motifs osidiques sur la face supérieure du cyclodécapeptide et un linker oxyamine sur la face inférieure est couplé avec un RAFT central **110** contenant quatre fonctions aldéhydes (Schéma 84). Le couplage entre les deux partenaires est un couplage oxime, réalisé dans les conditions classiques à 37°C en présence de 6 équivalents du glycocluster **255**. La réaction doit être soigneusement suivie par HPLC analytique pour prévenir d'éventuelles réactions de *trans-oximation* entre les sucres et les RAFT oxyamine. Ce genre de réaction secondaire a déjà été observé précédemment au laboratoire.^[254] Comme le montre le profil HPLC, au bout de 30 minutes le produit de départ **110** a été complètement consommé, on observe uniquement le cyclodécapeptide **255** en excès et l'hétérocluster **256** formé. Finalement, le mélange est isolé par HPLC semi-préparative pour conduire à l'hGC hexadécavalent **256** avec un rendement isolé de 87% (Figure 82).

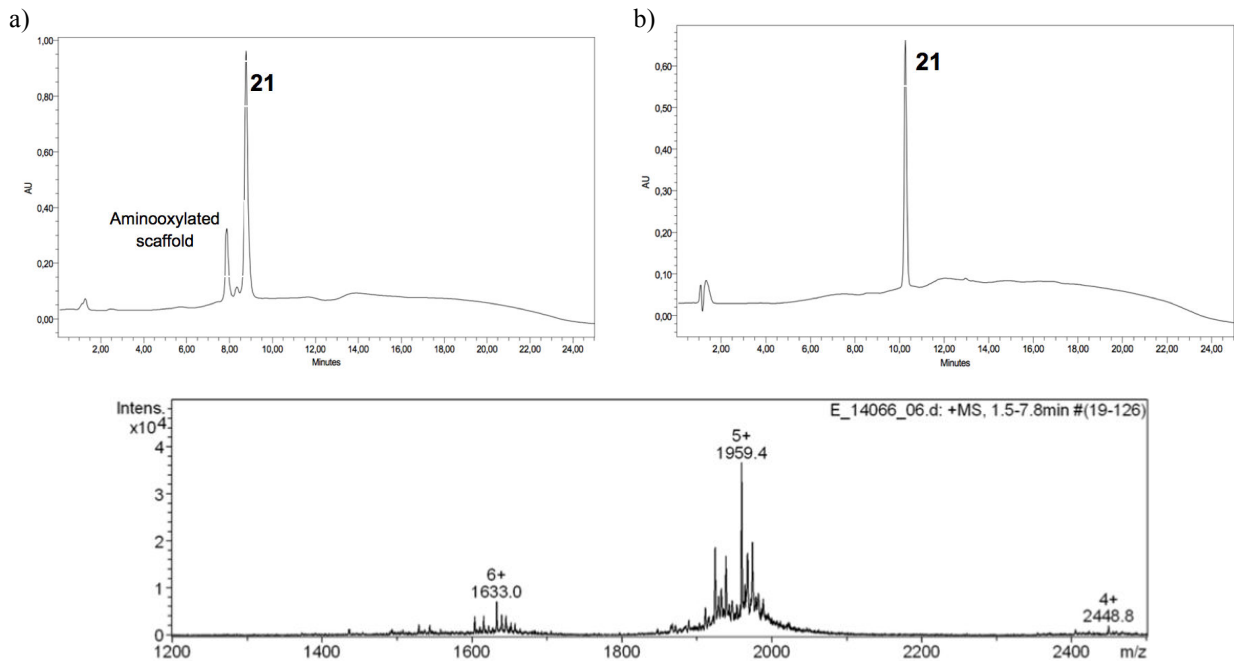


Figure 82 : a) Suivi HPLC de la réaction de couplage ; b) Profil HPLC du composé 255 après purification ; c) Spectre ESI-MS du composé 255

IV.B. Construction des candidats vaccins à base d'hétéroclusters

La dernière étape de notre travail a consisté à préparer des candidats vaccins en conjuguant les antigènes tumoraux Tn et TF par OL et par CuAAc puis un peptide immunostimulant OVA par formation d'un lien disulfure sur la plateforme glycosylée. Ainsi le châssis bi-fonctionnel 252 a été dissous dans de l'eau contenant 0,1% TFA puis l'antigène Tn (ou TF) en série oxyaminé (12 équivalents) a été ajouté. Après 1 heure, les analyses par HPLC et par UPLC-MS (*Figure 83*) indiquent que tout le réactif de départ a été consommé. De l'acétone est alors utilisée pour piéger l'excès d'oxyamine n'ayant pas réagi.

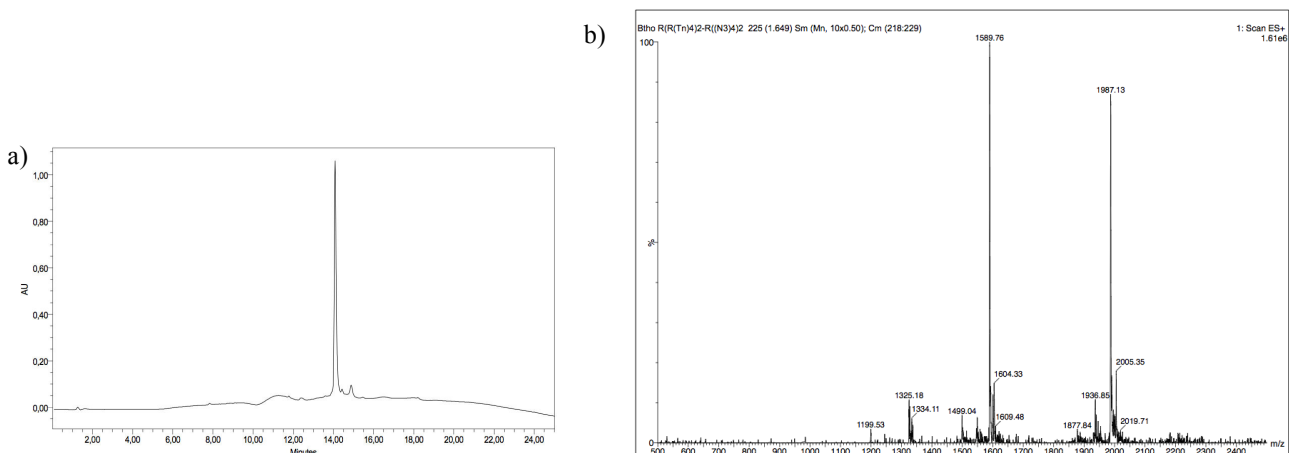


Figure 83 : a) Suivi HPLC de la réaction de couplage oxime ; b) Spectre ESI-MS du composé portant 8 Tn introduit par OL et 8 azotures

La réaction de cycloaddition a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en présence de 16 équivalents de TF (ou Tn) propargylé, 8 équivalents de CuSO₄, 32 équivalents de THPTA et 40 équivalents d'ascorbate de sodium. Au bout de 3 heures, la réaction est terminée comme en témoigne le profil HPLC (*Figure 84*), de la résine Chelex[®] est alors ajoutée puis le mélange est directement purifié par HPLC semi-préparative. Finalement, les hétéroclusters 8 Tn / 8 TF **257** et 8 TF / 8 Tn **258** sont isolés avec des rendements sur deux étapes de 76% et 71% respectivement, puis analysés par spectroscopie de masse (*Figure 84*).

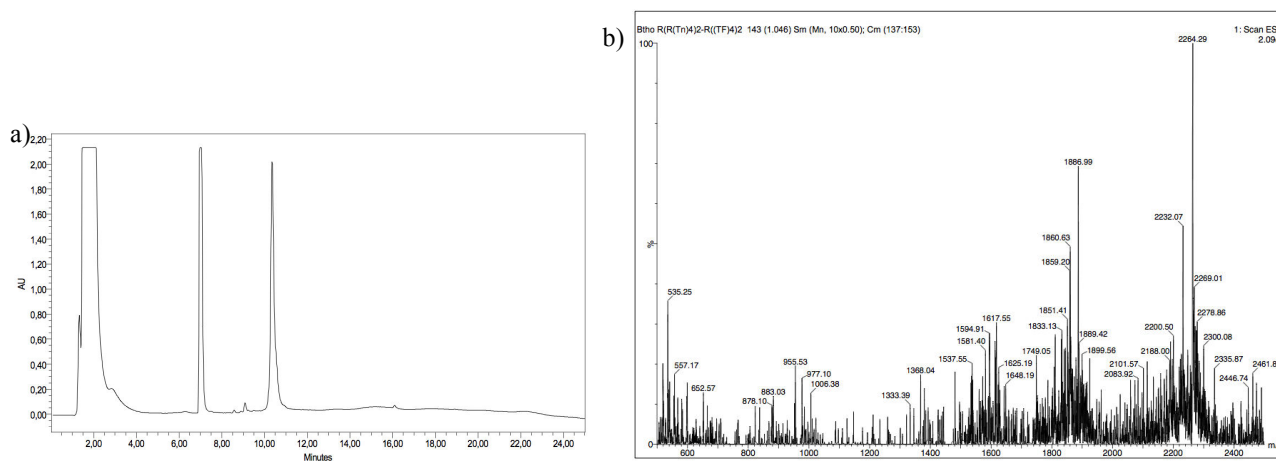


Figure 84 : a) Suivi HPLC de la réaction de cycloaddition ; b) Spectre ESI-MS du composé portant 8 Tn introduit par OL et 8 TF par CuAAC

Pour introduire le résidu cystéine, nous avons rencontré les mêmes difficultés liées à la solubilité que dans le cas des homoclusters **156-159** portant 16 Tn ou 16 TF. Comme décrit précédemment, la réaction a été réalisée dans du DMSO en présence de DIPEA. Dans ces conditions les hétéroglycoclusters 8 Tn / 8 TF **257** et 8 TF / 8 Tn **258** sont obtenus avec des rendements respectifs de 40% et 41% après purification (*Schéma 85*). Après la déprotection du groupement Boc, les composés **259** et **260** sont prêts à être conjugués avec le peptide chimère CD4⁺/CD8⁺ issu de l'ovalbumine **160**.

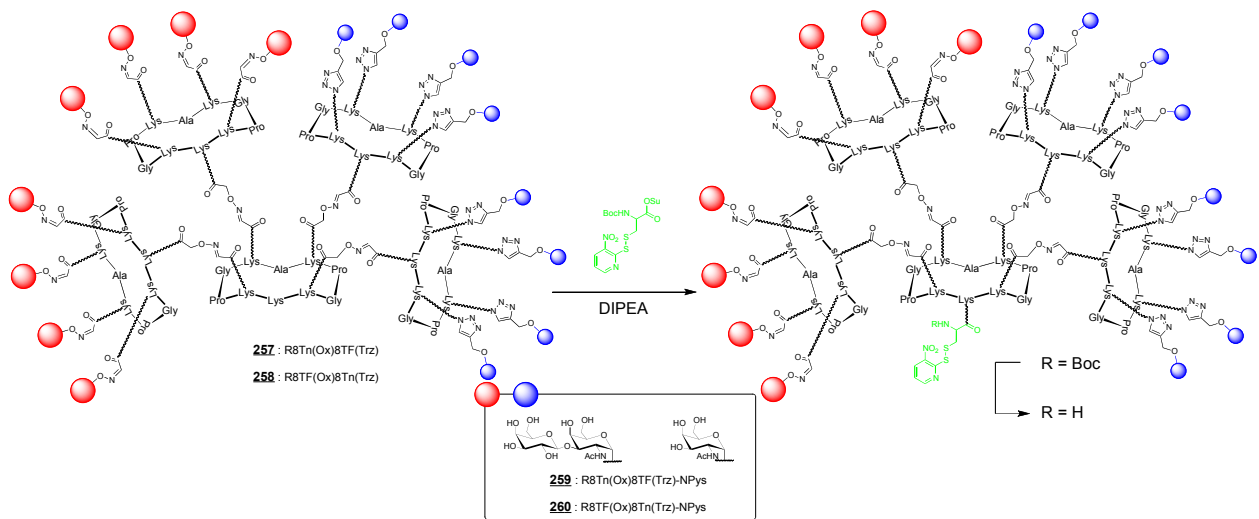


Schéma 85 : Introduction du résidu Cys-NPys 128 sur la face inférieure des hétéroclusters hexadécavalents

Malheureusement, comme dans le cas des composés homoclusters **156** à **159**, aucun des produits de couplage **261** et **262** n'a pu être caractérisé en spectrométrie de masse ESI ou MALDI (*Schéma 86*).

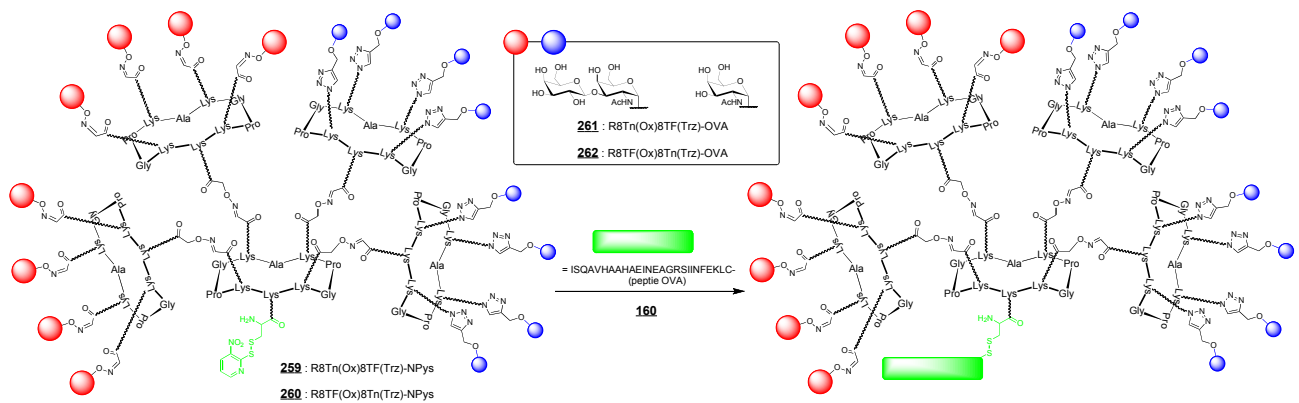


Schéma 86 : Construction des candidats vaccins hétéroclusters hexadécavalents 261 et 262

Cependant, une fois ces problèmes de caractérisation réglés, ces candidats vaccins **261** à **262** seront testés par l'équipe de C. Leclerc et R. Lo-Man à l'institut Pasteur de Paris. Il faut noter que des vaccins synthétiques multi-antigéniques de ce type n'ont jamais été décrits dans la littérature.

Chapitre V Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer des méthodologies de synthèse efficaces pour accéder à des nouvelles générations de vaccin contre le cancer plus efficaces.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la nature du lien chimique qui permet de relier les TACA à notre structure porteuse tétravalente. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs méthodes de ligations chimiosélectives : la ligation oxime (OL, « oxime ligation »), la cycloaddition de Huisgen (CuAAc, «Cu(I)-catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition ») et la thiol-ène (TEC, « thiol-ene coupling »). Dans un premier temps, les antigènes osidiques Tn et TF oxyaminés, propargylés ou thiolés ainsi que les plateformes peptidiques complémentaires ont été préparés. Ensuite, ces marqueurs ont été introduits sur la face supérieure du cyclopeptide alors que différents peptides immunostimulants de type CD4⁺ ont été conjugués sur la face inférieure par formation de pont disulfure. Les assemblages correspondants ont été testés en collaboration avec S. Paul de l'Université de St Etienne. Pour l'instant, aucun résultat significatif n'a été obtenu en raison de problèmes liés au protocole d'immunisation. La résolution de ces problèmes permettra de déterminer quel lien chimique sucre/plateforme et quelle séquence peptidique permettent d'induire une réponse humorale efficace. Dans cette même partie, nous avons synthétisé le premier exemple de vaccin composé de mimes d'antigène osidique. Pour cela, nous avons utilisé le mime de l'antigène Tn développé dans l'équipe du Prof. C. Nativi en espérant améliorer les propriétés immunologiques et la stabilité *in vivo* de nos glycoconjugués. L'étude immunologique complète réalisée en collaboration avec le groupe de L. BenMohamed a notamment permis de démontrer la production de fortes quantités d'anticorps capables de reconnaître des cellules qui expriment l'antigène Tn, en particulier des IgG, ainsi qu'un effet thérapeutique.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous avons cherché à augmenter la densité osidique de nos systèmes homoclusters à travers différentes architectures peptidiques car ce paramètre est également connu pour influencer l'efficacité d'une réponse immunitaire. Des composés hexadécavalents ont notamment été obtenus très efficacement en suivant un processus d'assemblage itératif divergent basé sur la ligation oxime. Tout au long de cette thèse, nous avons choisi de mettre au point nos méthodologies de synthèse en utilisant des sucres modèles et non des antigènes osidiques plus difficiles à synthétiser, puis nous avons essayé de valoriser les composés obtenus avec des lectines. Nous avons tout d'abord synthétisé des constructions fonctionnalisées avec les sucres modèles (Gal, Man, Fuc) et nous avons étudié leurs propriétés de reconnaissance avec la lectine bactérienne LecB de *Pseudomonas aeruginosa* en collaboration avec l'équipe d'Anne

Imberty du CERMAV de Grenoble. Ces études ont permis d'identifier le meilleur inhibiteur connu à ce jour pour cette lectine, le RD₁₆ αFuc, qui est capable d'inhiber l'interaction de la LecB sur un polymère fucosylé de référence à une concentration subnanomolaire. L'étude par ITC a permis de mesurer une constante de dissociation de 28 nM. De plus des études de modélisation moléculaire nous ont permis de déterminer que cet effet pourrait être dû à une interaction de type « bind and jump ». Une nouvelle génération de composés 64-valents de haut poids moléculaire (~ 38 kDa) ont également été obtenus en suivant la même méthode. L'analyse de ces composés par dichroïsme circulaire et RMN DOSY a notamment montré une excellente monodispersité. L'étude de ce type de composé par ELLA avec la lectine végétale UEA-1 a permis ici encore de mettre en évidence des propriétés de reconnaissance très intéressantes.

Sur la base d'études récentes suggérant que le vaccin « idéal » devrait combiner plusieurs antigènes osidiques dans la même molécule, nous avons finalement développé des méthodes de synthèse pour accéder à des structures multivalentes hétérogènes de densité et composition osidique variable. Ainsi nous avons préparé des systèmes de faible densité comprenant entre deux (série 2 + 2, série 3 + 1 et série 4 + 2) et quatre (série 4 x 1) structures osidiques différentes par molécule en utilisant des ligations chimiosélectives orthogonales. Nous avons ensuite synthétisé des hétéroclusters de plus haute densité portant également deux (série 8 + 8) ou quatre motifs osidiques différents (série 4 x 4), en utilisant jusqu'à quatre méthodes différentes ce qui est sans précédent dans la littérature. Les hétéroglycoclusters présentant les sucres Man, Fuc et Gal sont actuellement à l'étude pour évaluer l'inhibition des lectines bactériennes LecA et LecB. De plus, l'application de ces méthodes de synthèse aux antigènes Tn et TF a conduit à des plateformes glycosylées prometteuses qui ont été conjugués à un peptide immunostimulant chimère CD4⁺-CD8⁺ pour réaliser des tests immunologiques.

Ce travail de thèse a nécessité des efforts importants en chimie de synthèse pour diversifier la structure de nos candidats vaccins. La plupart des composés ciblés a pu être synthétisé avec succès, en revanche nous n'avons pas obtenu à ce jour de résultats immunologiques qui permette de confirmer que les modifications structurales apportées à nos molécules sont bénéfiques. En effet, les tests réalisés sur les composés décrits au *Chapitre I* sont pour l'instant ininterprétables, et l'étude des composés décrits aux *Chapitres II et III* est en cours mais la durée nécessaire pour la réalisation de tests immunologiques étant très longue, nous sommes toujours en attente des résultats à ce jour. Par conséquent, la suite de ce travail sera évidemment dépendante des résultats immunologiques qui nous permettront de tirer des conclusions précises sur l'influence du lien, de la valence, de la composition osidique et de la nature du peptide immunostimulant. Un autre aspect important

concernera également le développement de méthodes de synthèses complémentaires pour améliorer la modularité de nos stratégies. Il sera également important de synthétiser d'autres antigènes osidiques comme le STn ou le STF pour obtenir des candidats vaccins portant quatre TACA différents par molécule, à l'image des vaccins semi-synthétiques développés par le groupe de Danishefsky. Enfin, une étape cruciale de ce projet concernera le développement d'une méthode de pré-évaluation biologique de nos composés que nous pourrons réaliser au laboratoire, comme par exemple de tests ELISA avec des anticorps commerciaux anti-TACA. En effet, la reconnaissance TACA-BCR étant une étape clé du processus immunitaire, ce type de test nous permettra de sélectionner les meilleurs ligands de ces anticorps pour réaliser des études immunologiques sur souris qui sont généralement couteuses, longues et fastidieuses.

Chapitre VI Partie Experimentale

I. Materials and equipments

I.A. Reagents

All chemical reagents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France) and were used without further purification. All protected amino acids belong to the L-series and Fmoc-Gly-Sasrin®, Rink-amide MBHA® and 2-chlorotriylchloride® resin were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP® was purchased from France Biochem.

I.B. Equipments

- *Chromatography*

For peptides and glycopeptides, analytical RP-HPLC was performed on Waters system equipped with a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Analysis was carried out at 1.0 mL/min (EC 125/3 nucleosil 300-5 C₁₈) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient (buffer A: 0.09% CF₃CO₂H in water; buffer B: 0.09% CF₃CO₂H in 90% acetonitrile). Preparative HPLC was performed on Gilson GX 281 equipped with a fraction collector or on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL/min nitrogen. Purifications were carried out at 22.0 mL/min (VP 250/21 nucleosil 100-7 C₁₈) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient.

For carbohydrate, progress of reactions was monitored by thin layer chromatography using silica gel 60 F254 precoated plates (Merck). Spots were visualised by UV light and by charring with 10% H₂SO₄ in EtOH for protected derivatives or 1% ninhydrine in EtOH for hydroxylamine derivatives. Silica gel 60 (0.063-0.2 mm or 70-230 mesh, Merck) was used for column chromatography.

- *¹H and ¹³C NMR*

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 MHz or Bruker Avance III 500 MHz spectrometers and chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm). Spectra were referenced to the residual proton solvent peaks relative to the signal of CDCl₃ (δ 7.27 and 77.23 ppm for ¹H and ¹³C) and D₂O (4.79 ppm for ¹H), assignments were done by GCOSY and GHMQC experiments. The anomeric configuration was established from $J_{1,2}$ coupling constant.

- *Diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) NMR*

This experiment, which allows the separation of multiple solute species, is classically used to determine the diffusion coefficients of compounds of different sizes. Pulse Gradient Spin Echo (PGSE) diffusion measurements were performed on a Bruker Avance III 500 MHz NMR spectrometer equipped with a direct Broadband cryo probe Prodigy 5 mm. The pulse sequence used was the Bruker ledbpgp2s sequence that incorporates bipolar gradients, stimulated echo and a longitudinal eddy current delay as the z filter. The four 2.1 ms gradient pulses with sine-bell shapes were incremented linearly from 2 to 60 G/cm in 64 steps. The diffusion time (Δ) was set to 140 ms with 32K data points in t2, a sweep width of 5000 Hz and 128 transients. The data were processed using the Bruker topspin 3 package. The diffusion constant of water recommended by Bruker ($1.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) was used to calibrate the instrument. The molecular sizes were estimated from the Stokes-Einstein equation. Considering the molecules as a hard sphere, hydrodynamic radius R_H can be determined using equation $R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$ where k_B is the Boltzmann constant (in J K^{-1}), T is the temperature in kelvin, η is the viscosity (in Pa.s) and D the diffusion coefficient (in m^2s^{-1}).

- *Mass spectroscopy (MS)*

ESI mass spectra of peptides and glycopeptides were measured on an Esquire 3000 spectrometer from Bruker or on an Acquity UPLC/MS system from Waters equipped with a SQ Detector 2. MALDI-TOF were performed on a AutoFlex I Bruker after sample pretreatment in an OligoR3 microcolumn (Applied Biosystems, USA) using 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix.

- *Circular dichroism spectroscopy (CD)*

Circular dichroism (CD) spectra were acquired with signal averaging on a Jasco J-810 Spectropolarimeter equipped with a Jasco Peltier PTC-423S temperature controller, and a baseline was recorded separately and subtracted. Far-UV spectra were recorded from 340 to 185 nm, in a quartz cell with 1 mm pathlength. Spectra are the averages of 4 scans and ellipticities are reported as molar ellipticity. To reduce noise on the curves the data were smoothed with Savitzky-Golay smoothing algorithm using a convolution window of 7 data points. Stock concentrations of glycodendrimers were determined by NMR using trimethylsilyl-2,2,3,3-tetrauteropropionate (TSP) as an internal concentration standard.

II. General procedures for peptides syntheses

II.A. Syntheses of linear protected peptides by SPPS: *Procedure A*

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertbutyl (Fmoc/tBu) protection strategy. In manual SPPS, device consisted in a glass reaction vessel fitted with a

sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12 h (typically overnight) with $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH_2Cl_2 until complete acid trace clearance. The 2-chlorotrityl resin was preloaded for 30 min in dry CH_2Cl_2 with *N*-Fmoc-protected amino acid substituted at 1 mmol/g and capped with 6 mL of methanol/DIPEA/ CH_2Cl_2 (2/1/17) for 5 min and then one more time for 10 min. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with CH_2Cl_2 (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of *N*-Fmoc-protected amino acid *in situ* activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with CH_2Cl_2 (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by TNBS test. TNBS test required a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF, a solution of DIPEA/DMF (1:9). Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at room temperature for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

N-Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH.

Automated syntheses of peptide are performed on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) using standard solid-phase methods or on 348 Ω Synthesizer (Advance ChemTech) using the same conditions as manual procedure.

II.B. Cleavage on the resin: *Procedure B*

The peptide was released from the resin using cleavage solution of :

- TFA: CH_2Cl_2 (1:99) for Sasrin® resin.
- AcOH:TFE: CH_2Cl_2 (1:2:8) for 2-chlorotritylchloride® resin.
- TFA:TIS: H_2O (97:1.5:1.5) for Rink Amide MBHA® resin.

Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether.

II.C. Cyclization reactions: *Procedure C*

All linear peptides (0.5 mM) were dissolved in DMF and the pH values were adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.2 eq.) was added and the solution stirred at room temperature for 1h. Solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in the minimum of CH₂Cl₂. Diethyl ether was added to precipitate peptides. Then they were triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials that were used in the next step without further purification.

II.D. Cleavage of protecting group N-ε: *Procedure D*

- *N-ε Boc/tBu: Procedure D1*

The peptide was dissolved in a solution of TFA/CH₂Cl₂ (1 :1). For -OtBu protecting group the peptide was treated with a cocktail of TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). The reaction mixture was stirred during 1h at room temperature. After the solution was concentrated, precipitated and washed with diethyl ether. This material was further used without additional purification.

- *N-ε Aloc: Procedure D2*

The Aloc-containing peptide was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂/DMF (3/1) under argon. 100 eq. of Phenylsilane and 0.2 eq. of Pd(PPh₃)₄ were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at room temperature. The mixture was treated with methanol before evaporation of the solvents under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) then finally precipitated, triturated and washed with diethyl ether affording compound as a white powder. This material was further used without additional purification.

II.E. Oxidative cleavage: *Procedure E*

The cyclodecapeptide was dissolved in water (10⁻²M) and NaIO₄ (10 eq./aldehyde) was added. The solution was stirred at room temperature for 30 min and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide as a white powder after freeze-drying.

III. General procedures for chemoselective ligation

III.A. Oxime ligation (OL): *Procedure F*

Hydrated aldehyde-containing cyclopeptide and aminoxy sugar (1.2 eq./aldehyde) were dissolved in 0.1% TFA in H₂O (10 mM). After stirring for 30 min at room temperature, analytical HPLC indicated complete conversion. The crude mixture was directly purified by preparative HPLC without additional treatment to give, after freeze-drying, the glycocluster as a flocculent powder.

III.B. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAc): *Procedure G*

▪ *Procedure G1*

The azide-containing cyclopeptide and propargyl glycosides (1.5 eq./azide) were dissolved in a solution of tBuOH/AcONH₄ 100 mM buffer pH 7.4 (1:1) and the copper micropowder (0.4 eq./azide) was added. After stirring 3h at room temperature, analytical HPLC indicated complete coupling reaction. The copper was removed by filtration then the crude reaction mixture was purified by preparative HPLC to remove the excess of glycosides. Glycopeptides were obtained as flocculent powders after freeze-drying.

▪ *Procedure G2*

The azide-containing cyclopeptide and propargyl glycosides (6 eq./azide) were dissolved in DMF, and a solution of CuSO₄ (1 eq./azide) in PBS buffer (100 mM) was added. Then was added a solution of THPTA (5 eq./azide) and sodium ascorbate (7 eq./azide) in PBS buffer (100 mM). All solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred at room temperature under argon and after 1h analytical HPLC indicate complete reaction coupling. Then Chelex® resin was added to remove excess of copper and the reaction mixture was directly purified by RP-HPLC affording pure compound as a white powder.

III.C. Thiol-ene coupling (TEC): *Procedure H*

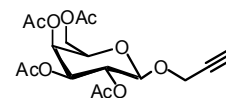
The alkene-containing cyclopeptide and thiol sugar (3eq./double bond) were dissolved in a mixture DMF/H₂O (2:1) and DPAP (0.3 eq./double bond) was added. The solution was irradiated at 365 nm for 30 min and after HPLC analysis directly purified by RP-HPLC to obtain compound as a white foam.

III.D. Thiol-Chloroacetyl coupling (TCC): *Procedure I*

The chloroacetyl-containing cyclopeptide and thiol sugar (3eq./chloroacetyl) were dissolved in a mixture DMF/H₂O (1:1), then KI (20 eq./chloroacetyl) and DIPEA (55 eq./chloroacetyl) was added. The suspension was left stirring for 1 h. The crude was injected in HPLC and complete disappear of starting material was registered with comparison of a new compound. The reaction mixture was directly purified by RP-HPLC affording glycopeptide as a white powder

IV. Carbohydrate syntheses

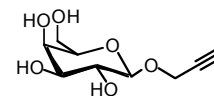
Prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside



To a solution of β -D-galactopyranose pentaacetate (1 g, 2.56 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 was added freshly distilled propargyl alcohol (0.565 mL, 9.72 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.811 mL, 6.4 mmol) at 0°C and the reaction mixture was allowed to reach room temperature for 16h. The solution was treated with an excess of Et_3N , diluted with CH_2Cl_2 and then the organic layer was washed with NaHCO_3 saturated solution (2x50 mL), dried MgSO_4 , and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel (Cyclohexane/AcOEt 3:2) to afford **prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside** (0.840, 2.17 mmol, 85%).

□ **NMR ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.39 (dd, 1H, $J = 3.4\text{Hz}$, 1Hz, **H-4**), 5.15 (dd, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, 10.4Hz, **H-2**), 4.99 (dd, 1H, $J = 10.4\text{Hz}$, 3.4Hz, **H-3**), 4.7 (d, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, **H-1**), 4.3 (d, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 4.11 (m, 2H, **H-6**), 3.9 (td, 1H, $J = 1\text{Hz}$, 6.6Hz, **H-5**), 2.46 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 2.08, 2.00, 1.98, 1.92 (4s, 12H, 4**COCH₃**).

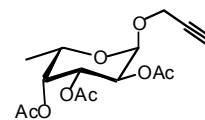
Prop-2-ynyl- β -D-galactopyranoside



To a solution of **prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside** in dry methanol, a solution of sodium methoxide (25 % in MeOH) was added until pH=8-9. This reaction was stirred at room temperature for 3h. Then Dowex 50W-X8 (H^+) resin was added (until pH=6) and the mixture was stirred during 10 minutes. After filtration, the reaction mixture was concentrated to yield **prop-2-ynyl- β -D-galactopyranoside** as a white solid (438 mg, 2.17 mmol, quantitative).

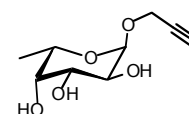
□ **NMR ^1H** (D_2O , 400 MHz): δ 4.53 (d, 1H, $J = 7.91\text{Hz}$, **H-1**), 4.43 (t, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 3.88 (d, 1H, $J = 3.3\text{Hz}$, **H-4**), 3.78-3.58 (m, 4H, **H-3**, **H-5**, **H-6**), 3.49 (dd, 1H, $J = 7.91\text{Hz}$, 9.72Hz, **H-2**), 2.87 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**).

□ **NMR ^{13}C** (75 MHz, D_2O): δ 101.2 (C-1), 76.2 (**CH₂-C \equiv CH**), 75.3 (**CH₂-C \equiv CH**), 72.7 (C-5), 70.5 (C-4), 68.6 (C-3), 60.9 (C-6), 56.5 (**OCH₂**), 48.9 (C-2).

Prop-2-ynyl-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-fucopyranoside

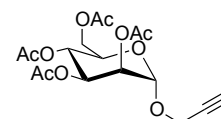
The compound **prop-2-ynyl-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-fucopyranoside** was obtained following the conditions described for **prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside** (0.44 mg, 1.34 mmol, 60%).

□ **NMR ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.29 (dd, 1H, $J = 10.8\text{Hz}, 3.3\text{Hz}$, **H-3**), 5.21 (dd, 1H, $J = 3.3\text{Hz}, 1\text{Hz}$, **H-4**), 5.18 (d, 1H, $J = 3.7\text{Hz}$, **H-1**), 5.05 (dd, 1H, $J = 3.7\text{Hz}, 10.8\text{Hz}$, **H-2**), 4.2 (d, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 4.08-4.02 (q, 1H, $J = 6.4\text{Hz}$, **H-5**), 2.36 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 2.09, 2.02, 1.91 (3s, 9H, **3COCH₃**), 1.08 (d, 3H, $J = 6.5\text{Hz}$, **CH₃**).

Prop-2-ynyl- α -D-fucopyranoside

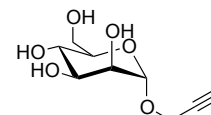
The compound **prop-2-ynyl- α -D-fucopyranoside** was obtained following the conditions described for **prop-2-ynyl- β -D-galactopyranoside** (100 mg, 2.17 mmol, quantitative).

□ **NMR ^1H** (D_2O , 400 MHz): δ 4.98 (d, 1H, $J = 3.5\text{Hz}$, **H-1**), 4.29 (t, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 4.06 (q, 1H, $J = 6.6\text{Hz}$, **H-5**), 3.82-3.72 (m, **3H, H-2, H-3, H-4**), 2.87 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 1.17 (d, 3H, $J = 6.6\text{Hz}$, **CH₃**).

Prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside

The compound **prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside** was obtained following the conditions described for **prop-2-ynyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside** (0.387 mg, 0.896 mmol, 70%).

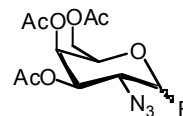
□ **NMR ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.26 (dd, 1H, $J = 3.4\text{Hz}, 10.0\text{Hz}$, **H-3**), 5.21 (dd, 1H, $J = 1.8\text{Hz}, 3.4\text{Hz}$, **H-2**), 4.95 (d, 1H, $J = 1.7\text{Hz}$, **H-1**), 4.24 (dd, 2H, $J = 5.2\text{Hz}, 12.2\text{Hz}$, **H-6**), 4.24 (d, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 4.00 (dd, 1H, **H-5**), 2.44 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 2.09, 2.04, 1.97, 1.94 (4 x s, 12H, **CH₃**).

Prop-2-ynyl- α -D-mannopyranoside

The compound **prop-2-ynyl- α -D-mannopyranoside** was obtained following the conditions described for **prop-2-ynyl- β -D-galactopyranoside** (68 mg, 0.336 mmol, quantitative).

□ **NMR ^1H** (D_2O , 400 MHz): δ 4.98 (s, 1H, **H-1**), 4.29 (t, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**), 3.90 (d, 1H, **H-2**), 3.87-3.81 (d, 1H, **H-5**), 3.79-3.70 (m, 2H, **H-3, H-4**), 3.67-3.57 (m, 2H, **H-6**), 2.87 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, **CH₂-C \equiv CH**).

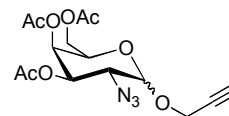
2-azido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-déoxy-D-galactopyrannosyl fluoride 86



To a solution of 91 (2.92g, 7.8 mmol) in CH₃CN (15 mL) was added Et₃N (0.75 mL) and Et₃N/3HF (3.1 mL) under nitrogen atmosphere and stirred at 50°C for 18h. Then, MeOH (5.0 mL) was added to quench Et₃N/3HF, and the solvent was concentrated. The residue was diluted with CH₂Cl₂, washed with water, NaHCO₃, brine, dried (MgSO₄), concentrated and purified by flash column chromatography (toluene/EtOAc = 4:1) to give 86 (1.97 g ; 76% ; $\alpha/\beta = 2:3$) and 92 (0.56 g ; 24%). Compound 92 was easily converted into 86 using DAST. To a solution of 92 (2.66 mg, 8.0 mmol) in THF (30 mL) was added DAST (1.3 mL, 8.2 mmol) at -20°C, and stirred at room temperature for 1h. Then, the solution was cooled to 0°C, and MeOH was added to quench DAST. The solution was concentrated, extracted with CH₂Cl₂, washed with water, NaHCO₃ saturated solution, brine, dried (MgSO₄) and concentrated. The crude residue was purified by flash column chromatography (toluene/EtOAc = 7:1, then 5:1) to give 86 (2.37 g ; 89% ; $\alpha/\beta = 1:4$).

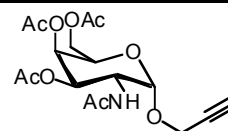
- **NMR ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm 5.71 (dd, 1H, $J = 2.6, 52.2$ Hz, **H-1**), 5.48 (dd, 1H, $J = 1.2, 3.2$ Hz, **H-4**), 5.36-5.34 (m, **H-3**), 5.32 (td, 1H, $J = 1.1, 3.3$ Hz, **H-4**), 5.09 (dd, 1H, $J = 7.5, 51.8$ Hz, **H-1**), 4.83 (ddd, 1H, $J = 0.8, 10.9$ Hz, **H-3**), 4.36 (td, 1H, $J = 6.4$ Hz, **H-5**), 4.17-4.06 (m, **H-6**), 3.96 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz, **H-5**), 3.78 (ddd, 1H, $J = 12.7$ Hz, **H-2**), 3.78-3.68 (m, **H-2**), 2.13-2.01 (6s, 6 \times OCOCH₃).
- **NMR ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz,) δ ppm 170.7 (C=O), 170.3 (C=O), 170.2 (C=O), 170.0 (C=O), 169.6 (C=O), 108.3 (C-1), 106.2 (C-1), 71.6 (C-5), 71.0 (C-3), 69.5 (C-5), 68.5 (C-3), 67.2 (C-4), 66.3 (C-4), 61.8 (C-6), 61.5 (C-6), 61.2 (C-2), 57.8 (C-2), 21.0 (OCOCH₃), 20.9 (OCOCH₃), 20.8 (OCOCH₃).

Prop-2-ynyl 2-azido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- α/β -D-galactopyrannoside 93



To a solution of glycosyl fluoride 86 (526 mg ; 1.6 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (17 mL) was added freshly distilled propargyl alcohol (373 μ L ; 6.4 mmol) and BF₃.Et₂O (470 μ L ; 3.84 mmol) at 0°C and the reaction mixture was allowed to reach room temperature for 4h. Then, the organic layer was washed with NaHCO₃ saturated solution (2x25 mL), dried MgSO₄ and concentrated to afford 93 (531 mg ; 90% ; $\alpha/\beta = 6:4$).

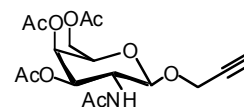
Prop-2-ynyl 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranoside 94



To a mixture of glycosyl 93 (230 mg ; 0.6 mmol) and acyl chloride (85 μ L ; 1.2 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (2,4 mL), was added dropwise a solution of triphenylphosphine (204 mg ; 0.78 mmol) in the same solvent (0,6 mL) at room temperature (r.t.). The reaction was monitored by TLC, immediately after the evolution of nitrogen had ceased and was worked up usually after 16h, unless otherwise stated. Thus, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (20 mL), washed once with NaHCO_3 saturated solution (5 mL) and then with water until neutral pH was achieved. After drying over Na_2SO_4 , the solution was filtered, evaporated to dryness and then purified (gradient : Et_2O then $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 99:1 until $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5) by column chromatography on silica gel to afford α anomer 94 (86 mg ; 0.21 mmol ; 35%).

- **NMR ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 5.5 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, NHCOCH_3), 5.3 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, **H-4**), 5.1-5.1 (dd, 1H, $J = 11.4, 3.3$ Hz, **H-3**), 5.0 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz, **H-1**), 4.6 (ddd, 1H, $J = 11.3, 9.8, 3.7$ Hz, **H-2**), 4.2 (dd, 2H, $J = 5.3, 2.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.1 (dd, 1H, $J = 10.7, 4.6$ Hz, **H-5**), 4.0 (dd, 2H, $J = 6.5, 2.4$ Hz, **H-6**), 2.4 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 2.1 (s, 3H), 2.0 (s, 3H), 1.9 (s, 3H), 1.9 (s, 3H).
- **NMR ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 171.0 (C=O), 170.6 (C=O), 170.4 (C=O), 170.2 (C=O), 96.8 (C-1), 78.4 (C-3'), 75.5 (C-1'), 68.4 (C-3), 67.4 (C-4, C-5), 61.8 (C-6), 55.4 (C-2'), 47.7 (C-2), 23.4 (CH_3), 20.9 ($2 \times \text{CH}_3$), 20.8 (CH_3).
- **MS (ESI $^+$ -MS)**: calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_9\text{Na}$: 408.1 ; found : 408.1 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

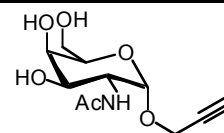
Prop-2-ynyl 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranoside



β anomer was obtained following the conditions described for 94 (77 mg ; 0.2 mmol ; 32%)

- **RMN ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz,) δ ppm 5.44 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, **NH**), 5.4 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, **H-4**), 5.3 (dd, 1H, $J = 11.1, 3.4$ Hz, **H-3**), 4.9 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, **H-1**), 4.4 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.1 (m, 2H, **H-6**), 4.0 (td, 1H, $J = 11.1, 8.7$ Hz, **H-2**), 3.9 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, **H-5**), 2.5 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 2.1 (s, 3H), 2.1 (s, 3H), 2.0 (s, 3H), 1.9 (s, 3H).

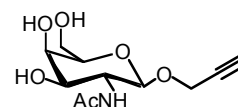
Prop-2-ynyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside 87



To a solution of GalNAc-O-propargyl 94 (222 mg ; 0.58 mmol) in MeOH (1 mL) was added NaOMe (63 μ L ; 0.06 mmol) and stirred at room temperature for 1h. Then, the solution was neutralized with Dowex 50W-X8 (H^+) resin, filtered and concentrated (143 mg ; 0.55 mmol ; 96%).

- **NMR 1H** (D_2O , 400 MHz) δ ppm 5.0 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, **H-1**), 4.27 (q, 2H, $J = 16$ Hz, **CH₂-C \equiv CH**), 4.16 (dd, 1H, $J = 11.1, 3.8$ Hz, **H-2**), 3.95 (m, 2H, $J = 12.3$, **H-4**, **H-5**), 3.87 (dd, 1H, $J = 11.1, 3.1$ Hz, **H-3**), 3.72 (dd, 2H, $J = 6.1, 2.3$ Hz, **H-6**), 2.01 (s, 3H, **NHCOCH₃**).
- **NMR ^{13}C** (D_2O , 75 MHz) δ ppm 174.7 (C=O), 96.1 (C-1), 71.4 (C-4), 68.5 (C-5), 67.6 (C-3), 61.1 (C-6), 55.1 (C-3'), 49.6 (C-2), 21.9 (CH₃).
- **MS (ESI⁺-MS)**: calcd for $C_{11}H_{17}NO_6Na$: 282.1 ; found : 282.0 [M + Na]⁺.

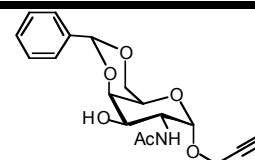
Prop-2-ynyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside



β anomer was obtained following the conditions described for 87 (49 mg ; 0.19 mmol ; 95%)

- **NMR 1H** (D_2O , 400 MHz) δ ppm 4.61 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, **H-1**), 4.38 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz, **CH₂-C \equiv CH**), 3.90 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, **H-3**), 3.86 (dd, 1H, $J = 10.6, 8.7$ Hz, **H-2**), 3.73 (m, 3H, **H-6**, **H-5**), 3.65 (dd, 1H, $J = 7.6, 4.4$ Hz, **H-4**), 2.87 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz, **CH₂-C \equiv CH**), 2.01 (s, 3H, **NHCOCH₃**).
- **NMR ^{13}C** (D_2O , 75 MHz) δ ppm 175 (C=O), 99.9 (C-1), 76.1 (C-2'), 75.3 (C-1', C-4), 71.0 (C-5), 68.8 (C-3), 60.9 (C-6), 56.7 (C-3'), 52.3 (C-2), 22.4 (CH₃).

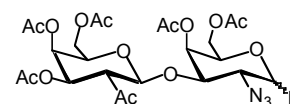
Prop-2-ynyl 2-acetamido-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- α -D-galactopyranoside 97



To a solution of GalNAc-O-propargyl 87 (101 mg, 0.36 mmol) in DMF (10 mL) was added benzaldehyde dimethylacetal (108 μ L ; 0.72 mmol) and CSA (21 mg ; 0.09 mmol). The solution was stirred at 50°C for 5h and neutralized with Et₃N (500 μ L) then concentrated. Flash column chromatography of the residue (Et₂O/MeOH 99:1 until Et₂O/MeOH 95:5) yielded of 97 (85 mg ; 0.23 mmol ; 64%).

- **NMR 1H** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm 7.55-7.33 (m, 5H, **Har**), 5.78 (d, 1H, $J = 8.99$ Hz, **NH**), 5.58 (s, 1H, **PhCH**), 5.12 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, **H-1**), 4.51 (ddd, 1H, $J = 10.8, 9.2, 3.5$ Hz, **H-2**), 4.31-4.23 (m, 5H, **H-4**, **CH₂-C \equiv CH**, **H-4**, **H-6**), 4.07 (dd, 1H, $J = 12.5, 1.3$ Hz, **H-5**), 3.84 (dd, 1H, $J = 10.9, 3.5$ Hz, **H-3**), 2.47 (t, 1H, $J = 2.4, 2.4$ Hz, **CH₂-C \equiv CH**), 2.04 (s, 3H, **NHCOCH₃**).
- **NMR ^{13}C** (D_2O , 75 MHz) δ ppm 129.2 (**HCar**), 128.3 (**HCar**), 126.3 (**Car**), 101.3 (**PhCH**), 97.5 (C-1), 75.4 (C-2'), 75.1 (C-1'), 69.2 (C-3', C-5), 68.9 (C-3), 63.5, 55.2 (C-4, C-6), 50.0 (C-2), 23.4 (CH₃).
- **MS (ESI⁺-MS)**: calcd for $C_{18}H_{21}NO_6Na$: 370.1 ; found : 370.1 [M + Na]⁺.

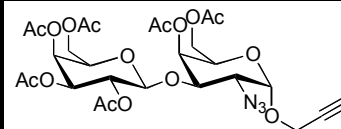
(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyrannosyl)-(1 \rightarrow 3')-2'-azido-4',6'-di-*O*-acetyl-2'-deoxy- α / β -D-galactopyrannoside fluoride 102



To a solution of glycosyl fluoride **86** (1.74g, 5.22 mmol) in MeOH (20 mL) was added NaOMe (27 mg, 0.52 mmol) and stirred at room temperature for 1 h. Then, the solution was neutralized with Dowex 50W-X8 [H⁺] resin, filtered, and concentrated. The concentrated mixture was dissolved in DMF (20 mL), and was added benzaldehyde dimethylacetal (1.57 mL, 10.4 mmol) and CSA (606 mg, 2.61 mmol). The solution was stirred at 50°C for 2 h, and neutralized with Et₃N (1.8 mL, 13 mmol) then concentrated. Flash column chromatography of the residue **100** (cyclohexane/EtOAc 4:1, then 2:1) yielded 1.51 g of **7** (98%) as colorless syrup.

A mixture of galactosyl imidate **96** (2.36 g, 4.8 mmol), glycosyl fluoride **100** (1.18 g, 4.0 mmol) and powdered molecular sieves 4 A (1.0 g) in dry CH₂Cl₂ (15 mL) was cooled to -15°C under nitrogen atmosphere. Then, TMSOTf (77 mL, 0.40 mmol) in CH₂Cl₂ (0.5 mL) was added dropwisely, and the mixture was stirred at -15°C for 2h. Then triethylamine (1.0 mL) was added to quench TMSOTf. The solution was filtered, concentrated and purified by flash column chromatography (toluene/EtOAc 6:1 then 1:1) to give **101** (2.17 g, 87%). To a solution of **101** (500 mg, 0.74 mmol) in MeOH (3 mL) was added CSA (21 mg, 0.09 mmol) and stirred at room temperature for 2 h. Then Et₃N (118 μ L, 0.84 mmol) was added to quench the reaction and concentrated. Then, the crude was dissolved in pyridine (2 mL) and acetic anhydride was added (118 μ L, 7.4 mmol). The solution was stirred for 6h at room temperature, concentrated and extracted with EtOAc, washed with 10% citric acid, sat. NaHCO₃, brine and dried (MgSO₄). The solution was evaporated and the residue was purified by flash chromatography (toluene/EtOAc 1:1) (407 mg ; 0.6 mmol ; 82% over two steps).

Prop-2-ynyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyrannosyl)-(1 \rightarrow 3')-4',6'-2'-azido-di-*O*-acetyl-2'-deoxy- α -D-galactopyrannoside

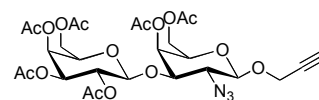


To a solution of glycosyl fluoride **102** (1.36 g ; 2.0 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (28 mL) was added freshly distilled propargyl alcohol (469 μ L ; 8.1 mmol) and BF₃.Et₂O (607 μ L ; 4.8 mmol) at 0°C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3h. Then, the organic layer was washed with sat. NaHCO₃, dried MgSO₄, concentrated and purified by flash chromatography (Et₂O/Cyclohexane 6:4 then 9:1) to afford the desired product (635 mg ; 0.94 ; α = 47%).

□ **NMR** ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm 5.47 (s, 1H, **H-4**), 5.36 (s, 1H, **H-4'**), 5.23 – 5.12 (m, 2H, **H-1 H-2'**), 5.00 (dd, 1H, J = 10.3, 2.0 Hz, **H-3'**), 4.71 (d, 1H, J = 7.7 Hz, **H-1'**), 4.37 – 4.22 (m, 2H, **CH₂-C \equiv CH**), 4.20 – 4.05 (m, 5H, **H-6 H-6' H-3**), 4.00 (dd, 1H, J = 12.3, 9.2 Hz, **H-5**), 3.89 (t, 1H, J = 6.5 Hz, **H-5'**), 3.75 (dd, 1H, J = 10.6, 2.7 Hz, **H-2**), 2.50 (t, 1H, **CH₂-C \equiv CH**), 2.15 (s, 3H, **COCH₃**), 2.13 (s, 3H, **COCH₃**), 2.06 (s, 9H, **COCH₃**), 1.97 (s, 3H, **COCH₃**).

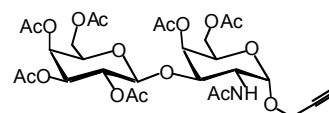
□ **NMR** ¹³C (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm 170.45, 170.36, 170.26, 170.07, 169.61, 169.50, 101.47, 96.47, 77.92, 77.21, 75.57, 74.51, 70.90, 70.82, 69.39, 68.82, 67.97, 66.83, 62.50, 61.08, 59.48, 55.11, 20.73, 20.66, 20.65, 20.63, 20.62, 20.52.

Prop-2-ynyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyrannosyl)-(1 \rightarrow 3')-2'-azido-4',6'-di-*O*-acetyl-2'-deoxy- β -D-galactopyrannoside



- **NMR** ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 5.35 (s, 2H, **H-4 H-4'**), 5.18 – 5.10 (m, 1H, **H-2'**), 5.01 (dd, 1H, $J = 10.5$, 3.0 Hz, **H-3'**), 4.71 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, **H-1'**), 4.53 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, **H-1**), 4.44 (s, 2H, **CH₂-C \equiv CH**), 4.12 (m, 4H, **H-6 H-6'**), 3.87 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz, **H-5'**), 3.77 (t, 1H, $J = 6.1$ Hz, **H-5**), 3.68 – 3.50 (m, 2H, **H-2 H-3**), 2.50 (t, 1H, **CH₂-C \equiv CH**), 2.15 (s, 3H, **COCH₃**), 2.12 (s, 3H, **COCH₃**), 2.07 (s, 3H, **COCH₃**), 2.07 (s, 3H, **COCH₃**), 2.05 (s, 3H, **COCH₃**), 1.98 (s, 3H, **COCH₃**).
- **NMR** ^{13}C (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm 170.49, 170.37, 170.25, 170.07, 169.73, 169.33, 101.47, 99.40, 77.96, 77.27, 75.61, 71.57, 70.74, 70.64, 68.80, 68.07, 66.80, 62.93, 62.16, 61.02, 60.35, 55.93, 20.69, 20.64, 20.61, 20.58, 20.51.

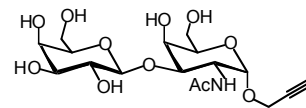
Prop-2-ynyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyrannosyl)-(1 \rightarrow 3')-2'-acetamido-4',6'-di-*O*-acetyl-2'-deoxy- α -D-galactopyrannoside 103



To a solution of disaccharide (170 mg ; 0.25 mmol) and acetic anhydride (118 μL ; 1.25 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (4 mL), was added dropwise a solution of triphenylphosphine (86 mg ; 0.32 mmol) in the same solvent (0.6 mL). The reaction was stirred for 16h at room temperature. Then the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL), washed once with NaHCO_3 saturated solution (2.5 mL) and with water until neutral pH was achieved. After drying over Na_2SO_4 , the solution was filtered, evaporated to dryness and then purified (gradient : Et_2O then $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 99:1 until $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5) by column chromatography on silica gel to afford α anomer 103 (144 mg ; 0.21 mmol ; 85%).

- **NMR** ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 5.71 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, **NH**), 5.42 – 5.33 (m, 2H, **H-4 H-4'**), 5.18 – 5.09 (m, 1H, **H-2'**), 5.06 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, **H-1**), 5.02 – 4.92 (m, 1H, **H-3'**), 4.61 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, **H-1'**), 4.56 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, **H-2**), 4.23 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, **CH₂-C \equiv CH**), 4.13 (m, 4H, **H-6 H-6'**), 4.01 (dd, 1H, $J = 9.8$, 5.4 Hz, **H-5**), 3.94 (dd, 1H, $J = 10.7$, 1.8 Hz, **H-3**), 3.87 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz, **H-5'**), 2.47 (t, 1H, **CH₂-C \equiv CH**), 2.17 (s, 3H, **COCH₃**), 2.14 (s, 3H, **COCH₃**), 2.07 (s, 6H, **NHCOCH₃ COCH₃**), 2.06 (s, 3H, **COCH₃**), 2.00 (s, 3H, **COCH₃**), 1.97 (s, 3H, **COCH₃**).
- **NMR** ^{13}C (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm 170.52, 170.42, 170.31, 170.15, 170.09, 169.75, 169.69, 100.66, 96.88, 78.46, 77.21, 75.23, 72.58, 70.90, 70.79, 68.83, 68.52, 67.90, 66.80, 62.44, 61.13, 55.17, 48.54, 23.36, 20.73, 20.73, 20.70, 20.67, 20.51.

Prop-2-ynyl *O*-(β -D-galactopyrannosyl)-(1 \rightarrow 3')-2'-azido-2'-deoxy- α -D-galactopyrannoside 99



To a solution of **103** (144 mg ; 0.21 mmol) in MeOH (1 mL) was added NaOMe (23 μ L ; 0.02 mmol) and stirred at room temperature for 1h. Then, the solution was neutralized with Dowex 50W-X8 (H^+) resin, filtered and concentrated (81 mg ; 0.19 mmol ; 92%).

□ **NMR 1H** (D_2O , 400 MHz) δ ppm 5.13 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, **H-1**), 4.53 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, **H-1'**), 4.43 (dd, 1H, $J = 10.9, 3.8$ Hz, **H-2**), 4.37 (d, 2H, $J = 11.9$ Hz, **CH₂-C \equiv CH**), 4.31 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, **H-4**), 4.14 – 4.04 (m, 2H, **H-3 H-5**), 3.97 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, **H-4'**), 3.88 – 3.76 (m, 4H, **H-6 H-6'**), 3.76 – 3.64 (m, 2H, **H-5' H-3'**), 3.62 – 3.54 (m, 1H, **H-2'**), 2.96 (s, 1H, **CH₂-C \equiv CH**), 2.09 (s, 3H, **NHCOCH₃**).

□ **NMR ^{13}C** (D_2O , 101 MHz) δ ppm 174.68, 104.72, 96.27, 77.08, 75.83, 75.02, 72.56, 71.06, 70.65, 68.67, 68.62, 61.04, 61.01, 55.04, 48.37, 22.04.

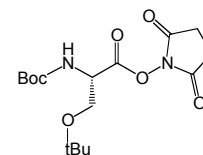
V. Building block syntheses

Boc-Ser(tBu)-N-hydroxysuccinimide ester 105

To a stirred solution of Boc-Ser(tBu)-OH (2.8 g, 10.7 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.8 g, 16 mmol) in EtOAc/dioxan (1:1, 100 mL) cooled on ice bath were added DCC (2.2 g, 10.7 mmol). After 5 h stirring at room temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite with EtOAc and the collected filtrate was concentrated in vacuum. The obtained oily residue was taken into 150 mL ethyl acetate and washed with 5 % aqueous NaHCO₃ (2 x 70 mL), water (2 x 70 mL) and brine (2 x 70 mL). The organic fraction was then dried over MgSO₄. Boc-Ser(tBu)-NHS 105 was obtained as a white powder after evaporation of the solvent (3.5 g, 9.8 mmol).

□ **Yield** : 90%.

□ **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 5.41 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 4.78 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 3.92 (1H, m), 3.66 (1H, m), 2.82 (4H, s), 1.46 (9H, s), 1.20 (9H, s).



RP-HPLC: RT = 13.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)

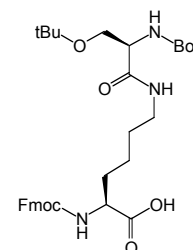
MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for
C₁₆H₂₇N₂O₇: 359.2
found: 359.3 [M+H]⁺

Fmoc-Lys(Boc-Ser(tBu))-OH 106

The above Boc-Ser(tBu)-NHS 105 (8.00 g, 22.3 mmol) in CH₂Cl₂ (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of finely powdered TFA-salt of Fmoc-lysine (8.19 g, 22.3 mmol) and DIPEA (2-4 equiv pH 9) in CH₂Cl₂ (130 mL). After 5 h reaction, the solvent was evaporated off in vacuum and the remaining residue was dissolved in EtOAc (400 mL), followed by washing with 10 % aqueous citric acid solution (70 mL), water (2 x 100 mL), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄ and evaporation under vacuum gave 12.5 g of 106 as white solid (20.5 mmol; 92%).

□ **Yield** : 92%.

□ **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) : δ 7.68 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.55 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.33-7.18 (4H, m), 6.84 (1H, s), 6.25 (1H, d), 5.62 (1H, s), 4.34-4.06 (5H, m), 3.63 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.20-3.05 (2H, m), 1.84 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.47-1.32 (14H, m), 1.09 (9H, s)



RP-HPLC: RT = 16.0 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)

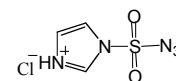
MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for
C₃₃H₄₅N₃O₈: 611.3
found: 611.2 [M+H]⁺

Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride

Sulfonyl chloride (16.1 mL, 200 mmol) was added drop-wise to an ice-cooled suspension of NaN_3 (13.0g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3h at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (400 mL), washed with H_2O (2×400 mL) then saturated aqueous NaHCO_3 (2×400 mL), dried over MgSO_4 and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the drop-wise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added drop-wise to the filtrate with stirring, the mixture chilled in an ice-bath, filtered and the filter cake washed with EtOAc (3×100 mL) to give **imidazole-1-sulfonyl azide** as colorless needles (26.4 g ; 125 mmol ; 63%).

□ **Yield** : 63%.

□ **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) : δ 9.53 (1 H, dd, $J = 1.3, 1.6$ Hz), 8.09 (1 H, dd, $J = 1.6, 2.2$ Hz), 7.68 (1H, dd, $J = 1.3, 2.2$ Hz)



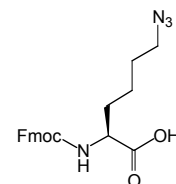
MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for
 $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 173.1
found: 173.0 [M+H]⁺

Fmoc-azidonorleucine **111**

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (3.68 g, 10 mmol) and ZnCl_2 (0.07 g, 0.5 mmol) in MeOH/Water (8:2, 80 mL) at room temperature was added DIPEA (pH=9-10) followed by imidazole-1-sulfonyl azide (3.1 g, 15 mmol). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. The reaction mixture was stirred overnight and the pH was acidified at 2 using HCl 3M. The mixture was extract with ethyl acetate (4 x 75 mL), then the combined organic phase was washed with brine (50 mL), dried over anhydrous Mg_2SO_4 , filtered and concentrated in order to obtain the building block **111** as a yellowish oil which was used without further purification (3.58 g, 9.1 mmol ; 91%).

□ **Yield** : 91%.

□ **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.75 (2H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.60 (2H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.38 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.29 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 5.3 (1H, d), 4.2 (2H, d), 4.12 (1H, t, $J = 6.9$ Hz), 3.8 (1H, m), 3.2 (2H, t), 1.9-1.1 (6H,m).



RP-HPLC: RT = 14,2 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)

MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for
 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$: 394.4
found: 394.2 [M+H]⁺

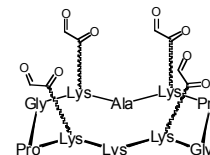
VI. Glycopeptides syntheses

VI.A. Homoclusters

$R(\text{CHO})_4-(\text{NH}_2)$ **120**

The linear decapeptide **107** was assembled on Fmoc-Gly-Sasrin® resin using the procedure A and modified amino acid **106** (loading of 0,7 mmol/g). The peptide was released from the resin using the general procedure B and cyclized following the procedure C. After cleavage of Boc/tBu protecting group using the procedure D1, the aldehyde-containing cyclodecapeptide **120** (15.0 mg, 10.9 μmol) was obtained following procedure E.

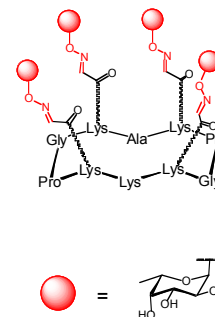
- **Yield** : 83%
- **RP-HPLC**: RT = 8.6 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $C_{55}H_{86}N_{15}O_{18}$: 1244.6; found: 1316.0 $[M+H_2O]^+$



$R(\alpha\text{Fuc})_4-(\text{NH}_2)$

Compound $R(\alpha\text{Fuc})_4-(\text{NH}_2)$ (6.2 mg, 3.4 μmol) was obtained following general procedure F.

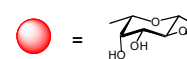
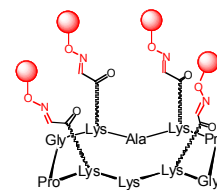
- **Yield** : 82%
- **RP-HPLC**: RT = 7.9 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $C_{76}H_{124}N_{18}O_{34}$: 1831.0; found: 1831.5 $[M+H]^+$



R(β Fuc)₄-(NH₂)

Compound **R(β Fuc)₄-(NH₂)** (6.1 mg, 3.3 μ mol) was obtained following general procedure F.

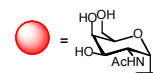
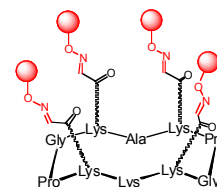
- Yield : 85%
- RP-HPLC: RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₇₆H₁₂₂N₁₈O₃₄Na₂: 1877.8; found: 1877.5 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(NH₂) **122**

Compound **122** (5.7 mg, 2.7 μ mol) was obtained following general procedure F.

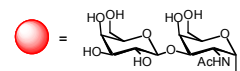
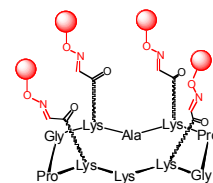
- Yield : 87%
- RP-HPLC: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₈₄H₁₃₅N₂₂O₃₈: 2060.9; found: 2061.1 [M+H]⁺



R(α TF)₄-(NH₂) **121**

Compound **121** (4.8 mg, 1.7 μ mol) was obtained following general procedure F.

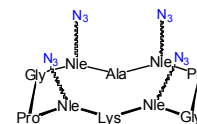
- **Yield** : 81%
- **RP-HPLC**: RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₁₁₁H₁₈₁N₂₃O₅₈: 2765.2; found: 2765.0 [M+H]⁺



R(N₃)₄-(NH₂) **113**

The linear decapeptide **112** was assembled on Fmoc-Gly-Sasrin® resin using the procedure A and modified amino acid **111** (loading of 0,7 mmol/g). The peptide was released from the resin using the general procedure B and cyclized following the procedure C. After cleavage of Boc protecting group using the procedure D1, the azide-containing cyclodecapeptide **113** was used without any further purification.

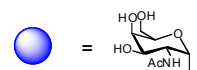
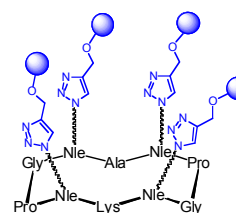
- **RP-HPLC**: RT = 12.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₄₇H₇₈N₂₃O₁₀: 1124.6; found: 1124.2 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(NH₂) **124**

Compound **124** (2.7 mg, 1.2 μ mol) was obtained following general procedure G1.

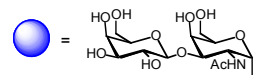
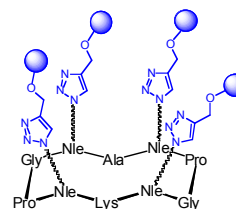
- **Yield** : 77%
- **RP-HPLC**: RT = 8.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₉₁H₁₄₄N₂₇O₃₄: 2160.0; found: 2160.0 [M+H]⁺



R(α TF)₄-(NH₂) **123**

Compound **123** (2.1 mg, 0.75 μ mol) was obtained following general procedure G1.

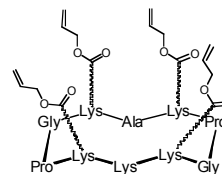
- Yield : 73%
- RP-HPLC: RT = 8.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₁₁₅H₁₈₅N₂₇O₅₄: 2809.2; found: 2809.6 [M+H]⁺



R(Aloc)₄-(NH₂) **125**

The linear decapeptide **114** was assembled on Fmoc-Gly-Sasrin® resin using the procedure A (loading of 0,7 mmol/g). The peptide was released from the resin using the general procedure B and cyclized following the procedure C. After cleavage of Boc protecting group using the procedure D1, the alkene-containing cyclodecapeptide **125** was used without any further purification.

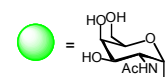
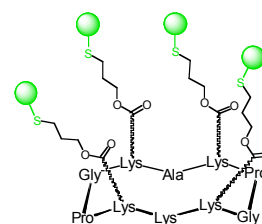
- RP-HPLC: RT = 14.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₆₃H₁₀₂N₁₅O₁₈: 1356.7; found: 1356.8 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(NH₂) **126**

Compound **126** (3.3 mg, 1.4 μ mol) was obtained following general procedure H.

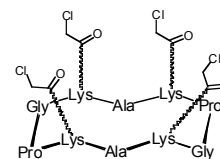
- Yield : 71%
- RP-HPLC: RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₉₅H₁₆₂N₁₉O₃₈S₄: 2306.0; found: 2306.6 [M+H]⁺



R(AcCl)₄-(NH₂) 119

The linear decapeptide 116 was assembled on Fmoc-Gly-Sasrin® resin using the procedure A (loading of 0,7 mmol/g). The peptide was released from the resin using the general procedure B and cyclized following the procedure C. After cleavage of Boc protecting group using the procedure D1, the glycopeptide R(Lys)₄ (10.5 mg, 10.9 μmol) was dissolved in 2 mL of DMF, then chloroacetic anhydride (11.1 mg, 65.4 μmol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, the mixture was evaporated and purified by RP-HPLC.

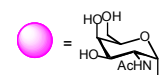
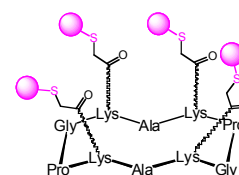
- **RP-HPLC**: RT = 11.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₅₂H₈₂N₁₄O₁₄Cl₄: 1268.5; found: 1268.1 [M+H]⁺



R(αTn)₄-(NH₂) 127

Compound 127 (1.3 mg, 0.62 μmol) was obtained following general procedure I.

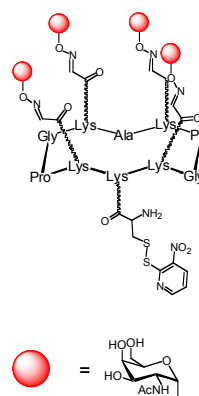
- **Yield** : 81%
- **RP-HPLC**: RT = 7.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₈₄H₁₃₉N₁₈O₃₄S₄: 2072.9; found: 2072.1 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(NPys) Oxime 131

The glycopeptide 122 (7.7 mg, 3.6 μ mol) was dissolved in 250 μ L of DMF, then BocNPys-NHS 128 (3.4 mg, 7.3 μ mol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling, the Boc protecting group was removed using general procedure D1 and then the mixture was evaporated and purified by RP-HPLC (7.9 mg, 3.3 μ mol).

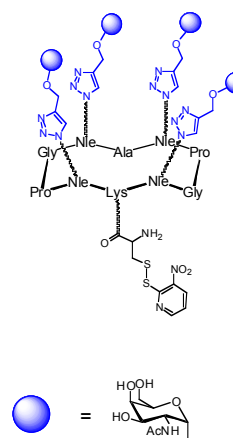
- **Yield** : 91%
- **RP-HPLC**: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₉₅H₁₄₉N₂₆O₄₁S₂: 2374.9; found: 2375.3 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(NPys) CuAAc 130

The compound 130 was obtained following the conditions described for 131 (7.6 mg, 3.2 μ mol).

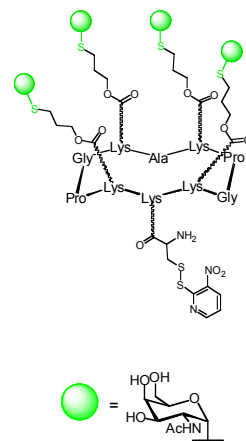
- **Yield** : 91%
- **RP-HPLC**: RT = 8.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₉₉H₁₅₃N₃₀O₃₇S₂: 2419.0; found: 2419.2 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(NPys) TEC 129

The compound **129** was obtained following the conditions described for **131** (5.2 mg, 2.0 μ mol).

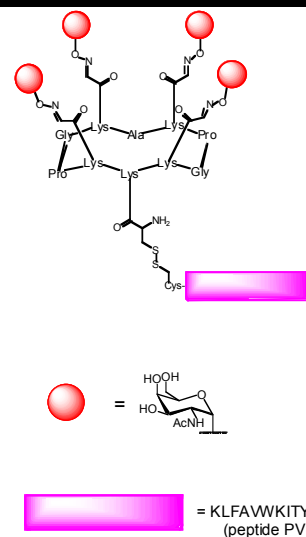
- **Yield** : 86%
- **RP-HPLC**: RT = 7.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₁₀₃H₁₆₈N₂₂O₄₁S₆: 2562.0; found: 2562.4 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(PV) Oxime 134

The glycopeptide **131** (2.5 mg, 1.1 μ mol) was dissolved in 2 mL of DMF/ PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/ argon. Then the peptide PV1 (1.8 mg, 1.1 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 15 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC (2.6 mg, 0.67 μ mol).

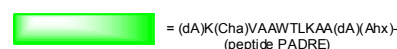
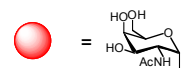
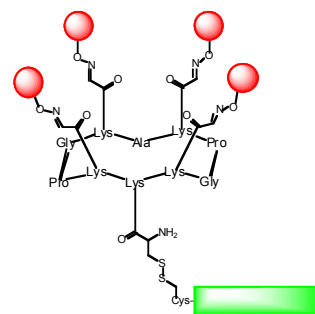
- **Yield** : 61%
- **RP-HPLC**: RT = 8.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₁₇₂H₂₇₀N₄₃O₅₈S₂: 3931.9; found: 3932.0 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(PADRE) Oxime 137

The glycopeptide **131** (2.5 mg, 1.1 μ mol) was dissolved in 1.5 mL of DMF/ PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/ argon. Then the peptide PADRE (1.7 mg, 1.1 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 15 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC (2.4 mg, 0.64 μ mol).

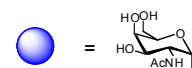
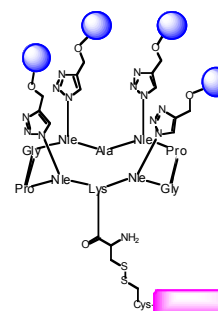
- Yield : 58%
- RP-HPLC: RT = 8.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₁₆₄H₂₆₈N₄₃O₅₅S₂: 3785.9; found: 3786.1 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(PV) CuAAc 133

The compound **133** was obtained following the conditions described for **134** (2.3 mg, 0.57 μ mol).

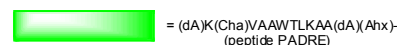
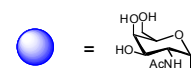
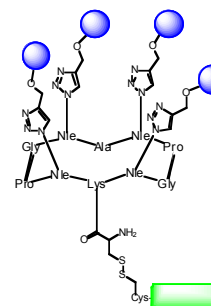
- Yield : 57%
- RP-HPLC: RT = 8.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₁₇₆H₂₇₅N₄₇O₅₄S₂: 3976.9; found: 3977.0 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(PADRE) CuAAc 136

The compound **136** was obtained following the conditions described for **137** (3.5 mg, 0.91 μ mol).

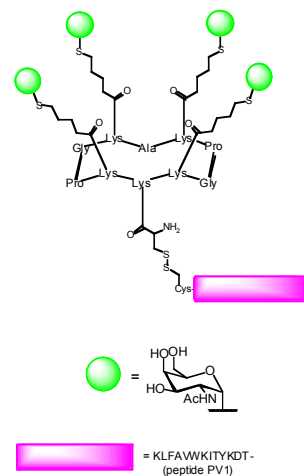
- Yield : 55%
- RP-HPLC: RT = 8.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₁₆₈H₂₇₄N₄₇O₅₁S₂: 3831.9; found: 3831.8 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(PV) TEC 132

The compound **132** was obtained following the conditions described for **134** (2.1 mg, 0.51 μ mol).

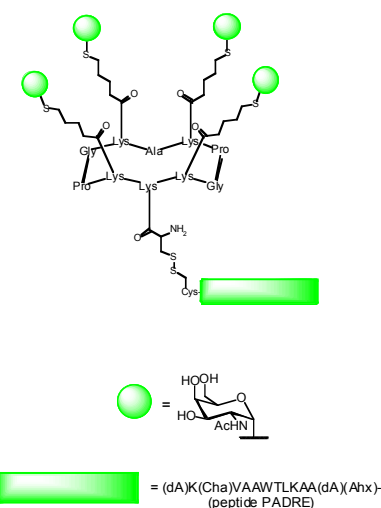
- **Yield** : 52%
- **RP-HPLC**: RT = 7.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₁₈₀H₂₉₂N₃₉O₅₈S₆: 4121.9; found: 4122.1 [M+H]⁺



R(α Tn)₄-(PADRE) TEC 135

The compound **135** was obtained following the conditions described for **137** (2.5 mg, 0.62 μ mol).

- **Yield** : 57%
- **RP-HPLC**: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₁₇₂H₂₈₉N₃₉O₅₅S₆: 3974.9; found: 3974.9 [M+H]⁺



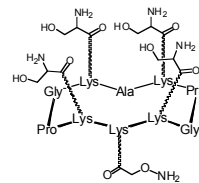
R(Ser)₄-(ONH₂) **144**

The linear decapeptide R(BocSer(tBu))₄-(Aloc) **141** was assembled on Gly-Sasrin® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) by incorporation of the building block **106** using the general procedure A, following by the cyclisation with the conditions of general procedure C and the Aloc protecting group was removed using procedure D2. Then the cyclodecapeptide (150 mg, 75 µmol) was dissolved in 15 mL of DMF, BocAaa-NHS **142** (3.2 mg, 0.13 mmol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After cleavage of Boc/tBu protecting group using the procedure D1 the solution was evaporated and fully deprotected cyclopeptide was directly purified by preparative HPLC.

□ **RP-HPLC**: RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm 5-40% B in 20 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

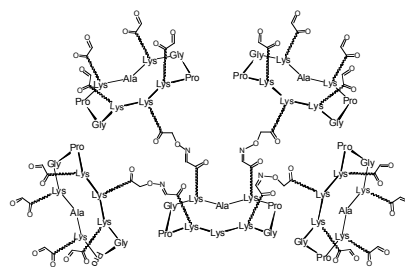
m/z calcd for C₆₁H₁₀₉N₂₀O₂₀: 1441.8; found: 1442.5 [M+H]⁺



RR(CHO)₁₆-(NH₂) **146**

A solution of R(CHO)₄-(NH₂) **120** (5.7 mg, 4.6 μmol) and R(Ser)₄-(ONH₂) **144** (39.6 mg, 27.5 μmol) was assembled using general procedure F. After 2h, analytical HPLC shows the quantitative conversion into the RR-Ser₁₆. After addition of acetone (100 μL) to the crude reaction mixture, compound **145** was oxidized following procedure E to obtain the aldehyde-containing peptide RR-CHO_{16 **146** (26.7 mg, 4.1 μmol).}

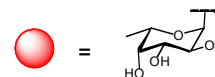
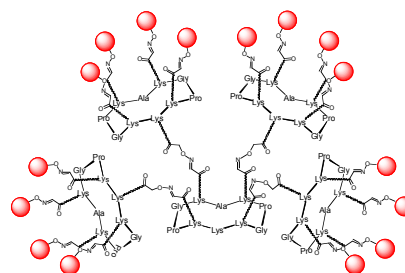
- **Yield** : 90%
- **RP-HPLC**: RT = 8.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₂₈₃H₄₃₀N₇₉O₉₄: 6442.1; found: 6442.3 [M+H]⁺



RR(αFuc)₁₆-(NH₂)

Compound RR(αFuc)₁₆-(NH₂) (3.1 mg, 0.48 μmol) was obtained following general procedure F.

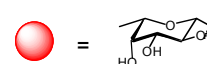
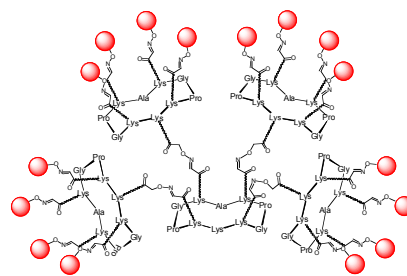
- **Yield** : 89%
- **RP-HPLC**: RT = 7.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (MALDI-TOF-MS)**:
m/z calcd for C₃₇₉H₆₀₇N₉₅O₁₅₈: 9022.2; found: 9022.2 [M+H]⁺



RR(β Fuc)₁₆-(NH₂)

Compound **RR(β Fuc)₁₆-(NH₂)** (2.3 mg, 0.36 μ mol) was obtained following general procedure F.

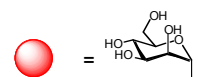
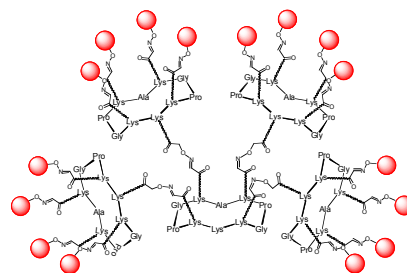
- Yield : 88%
- RP-HPLC: RT = 7.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (MALDI-TOF-MS):
m/z calcd for C₃₇₉H₆₀₇N₉₅O₁₅₈: 9022.2; found: 9022.3 [M+H]⁺



RR(α Man)₁₆-(NH₂)

Compound **RR(α Man)₁₆-(NH₂)** (3.8 mg, 0.59 μ mol) was obtained following general procedure F.

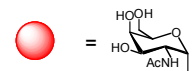
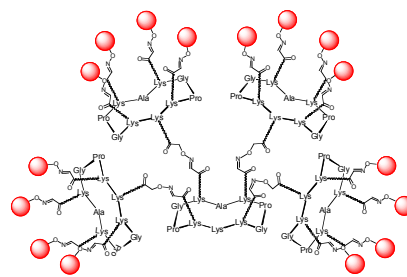
- Yield : 88%
- RP-HPLC: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (MALDI-TOF-MS):
m/z calcd for C₃₇₉H₆₀₄N₉₅O₁₇₄Na: 9298.1; found: 929802 [M+H]⁺



RR(α Tn)₁₆-(NH₂) 152

Compound 152 (1.8 mg, 0.28 μ mol) was obtained following general procedure F.

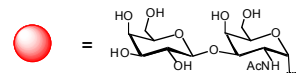
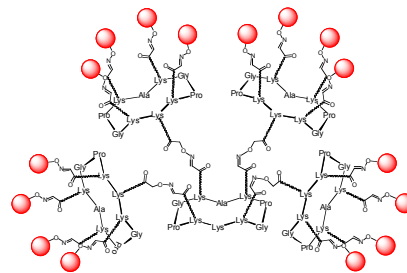
- Yield : 90%
- RP-HPLC: RT = 7.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (MALDI-TOF-MS):
m/z calcd for C₄₁₁H₆₅₅N₁₁₁O₁₇₄: 9934.6; found: 9934.0 [M+H]⁺



RR(α TF)₁₆-(NH₂) 153

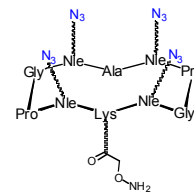
Compound 153 (2.4 mg, 0.19 μ mol) was obtained following general procedure F.

- Yield : 81%
- RP-HPLC: RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (MALDI-TOF-MS):
m/z calcd for C₅₀₇H₈₁₃N₁₁₁O₂₅₄: 12526.4; found: 12526.9 [M+H]⁺



$R(N_3)_4-(ONH_2)$ **150**

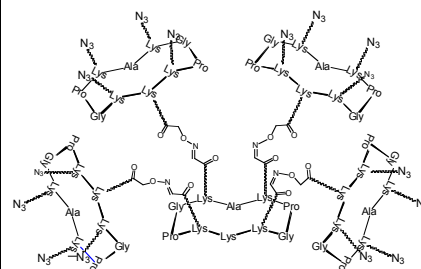
The linear decapeptide **147** was assembled on Fmoc-Gly-Sasrin® resin using the [procedure A](#) and modified amino acid **111** (loading of 0,7 mmol/g). The peptide was released from the resin using the general [procedure B](#) and cyclized following the [procedure C](#). After cleavage of Boc protecting group using the [procedure D1](#), the cyclodecapeptide $R(N_3)_4-(NH_2)$ **113** (11.7 mg, 10.4 μ mol) was dissolved in 5 mL of DMF, then BocAaa-NHS **142** (4.5 mg, 15.6 μ mol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling and the mixture was evaporated, and then the Boc protecting group was removed using the [procedure D1](#). Finally the compounds **150** was purified by RP-HPLC (11.8 mg, 9.9 μ mol).



- **Yield** : 95%
- **RP-HPLC**: RT = 11.9 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $C_{49}H_{80}N_{24}O_{12}$: 1196.6; found: 1197.1 $[M+H]^+$

$RR(N_3)_{16}-(NH_2)$ **151**

The cyclopeptide $R(CHO)_4-(NH_2)$ **120** (4.7 mg, 3.8 μ mol) and $R(N_3)_4-(ONH_2)$ **150** (27.1 mg, 22.7 μ mol) was assembled following the general [procedure F](#) (19.4 mg, 3.2 μ mol).

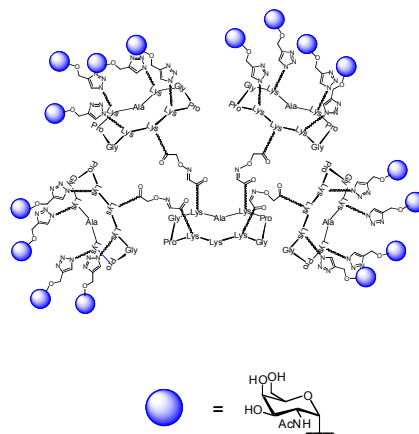


- **Yield** : 86%
- **RP-HPLC**: RT = 16.4 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $C_{251}H_{397}N_{111}O_{62}$: 5961.1; found: 5961.8 $[M+H]^+$

RR(α Tn)₁₆-(NH₂) 154

Compound 154 (2.5 mg, 0.25 μ mol) was obtained following general procedure G2.

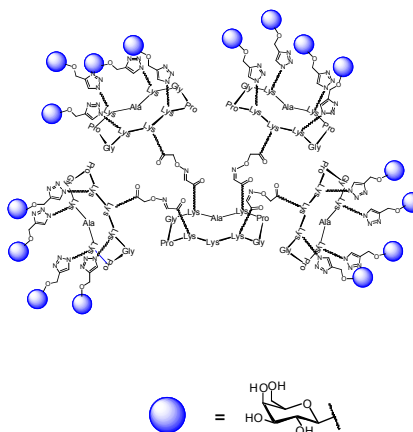
- Yield : 83%
- RP-HPLC: RT = 8.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₄₂₇H₆₆₉N₁₂₇O₁₅₈: 10108.8; found: 10109.1 [M+H]⁺



RR(β Gal)₁₆-(NH₂)

Compound RR(β Gal)₁₆-(NH₂) (1.9 mg, 0.21 μ mol) was obtained following general procedure G2.

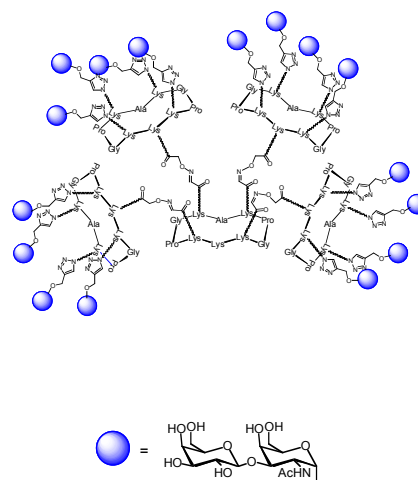
- Yield : 81%
- RP-HPLC: RT = 8.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₃₉₅H₆₁₆N₁₁₁O₁₅₈: 9447.4; found: 9447.3 [M+H]⁺



RR(α TF)₁₆-(NH₂) 155

Compound 155 (2.2 mg, 0.17 μ mol) was obtained following general procedure G2.

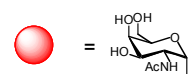
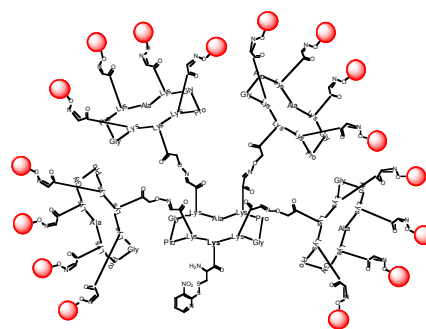
- Yield : 77%
- RP-HPLC: RT = 8.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₅₂₃H₈₃₇N₁₃₅O₂₃₈: 12823.8; found: 12823.8 [M+H]⁺



RR(α Tn)₁₆-(NPys) oxime 156

The glycopeptide RR(Tn)₁₆-(NH₂) 152 (2.5 mg, 0.25 μ mol) was dissolved in 200 μ L of DMSO, then BocNPys-NHS 128 (0.24 mg, 0.5 μ mol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling and then the Boc protecting group was removed using general procedure D. The mixture was evaporated and purified by RP-HPLC (1.1 mg, 0.11 μ mol).

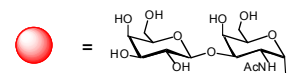
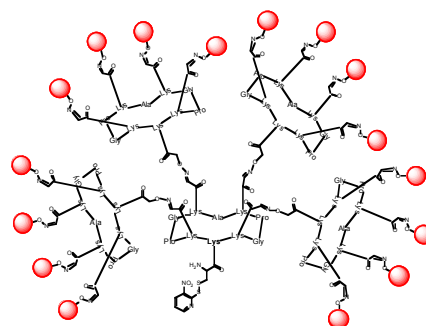
- **Yield** : 45%
- **RP-HPLC**: RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₄₁₉H₆₆₀N₁₁₄O₁₇₇S₂: 10189.6; found: 10190.1 [M+H]⁺



RR(α TF)₁₆-(NPys) oxime 157

The compound 157 was obtained following the procedure of synthesis of 156 (0.75 mg, 0.06 μ mol).

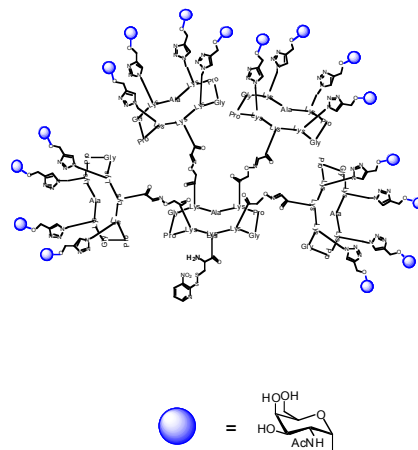
- **Yield** : 35%
- **RP-HPLC**: RT = 7.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₅₁₅H₈₂₀N₁₁₄O₂₅₇S₂: 12784.4; found: 12784.1 [M+H]⁺



RR(α Tn)₁₆-(NPys) CuAAc 158

The compound 158 was obtained following the procedure of synthesis of 156 (1.1 mg, 0.1 μ mol).

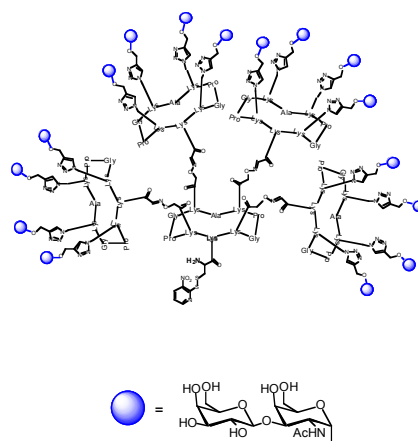
- Yield : 41%
- RP-HPLC: RT = 8.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₄₃₅H₆₇₆N₁₃₀O₁₆₁S₂: 10366.8; found: 10366.7 [M+H]⁺



RR(α TF)₁₆-(Npys) CuAAc 159

The compound 159 was obtained following the procedure of synthesis of 156 (0.65 mg, 0.05 μ mol).

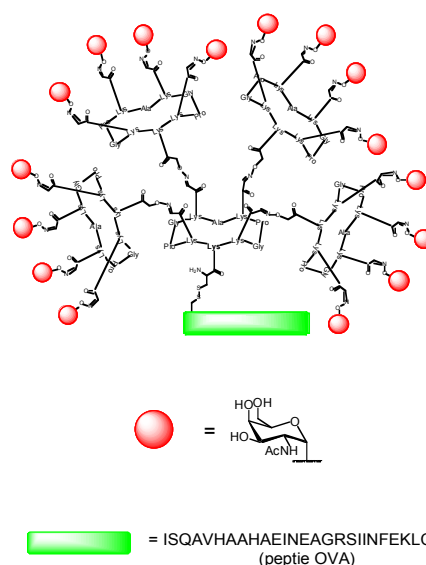
- Yield : 32%
- RP-HPLC: RT = 8.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- SM (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₅₃₁H₈₄₄N₁₃₈O₂₄₁S₂: 13080.8; found: 10380.8 [M+H]⁺



RR(α Tn)₁₆-(OVA) oxime 161

The glycopeptide RR(Tn)₁₆-(NPys) 156 (1.1 mg, 0.11 μ mol) was dissolved in 250 μ L of DMF/ PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/argon. Then the peptide OVA 160 (0.3 mg, 0.11 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC

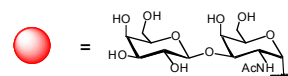
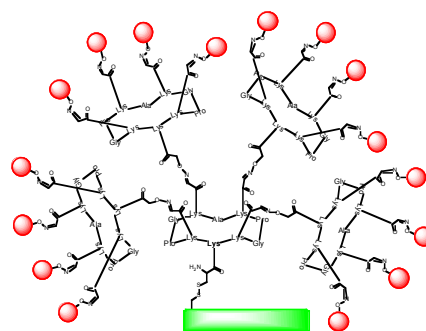
- Yield : 71% (HPLC)
- RP-HPLC: RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- SM (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₅₃₆H₈₅₄N₁₅₀O₂₁₂S₂: 12855.0; found:



RR(α TF)₁₆-(OVA) oxime 162

The glycopeptide RR(TF)₁₆-(NPys) 157 (0.75 mg, 0.06 μ mol) was dissolved in 200 μ L of DMF/ PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/argon. Then the peptide OVA 160 (0.16 mg, 0.06 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC.

- **Yield** : 70% (HPLC)
- **RP-HPLC**: RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **SM (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₆₃₂H₁₀₁₄N₁₅₀O₂₉₂S₂: 15448.8; found:

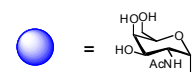
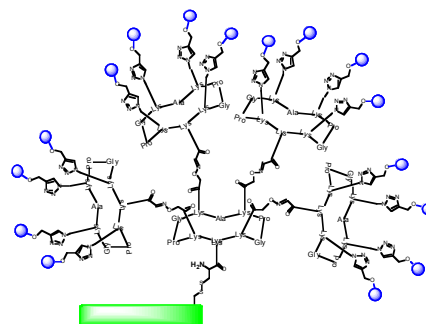


█ = ISQAVHAAHAEINEAGRSIINFEKLC-
(peptide OVA)

RR(α Tn)₁₆-(OVA) CuAAc 163

The glycopeptide RR(Tn)₁₆-(NPys) 158 (1.1 mg, 0.11 μ mol) was dissolved in 250 μ L of DMF/ PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/argon. Then the peptide OVA 160 (0.3 mg, 0.11 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC.

- **Yield** : 77% (HPLC)
- **RP-HPLC**: RT = RT = 8.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **SM (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₅₅₂H₈₇₀N₁₆₆O₁₉₆S₂: 13031.3; found:

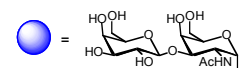
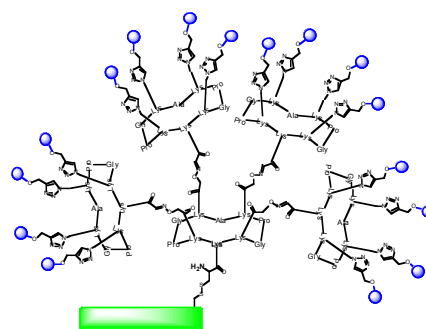


█ = ISQAVHAAHAEINEAGRSIINFEKLC-
(peptide OVA)

RR(α TF)₁₆-(OVA) CuAAc 164

The glycopeptide RR(TF)₁₆-(NPys) 159 (0.65 mg, 0.05 μ mol) was dissolved in 200 μ L of DMF/ PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/argon. Then the peptide OVA 160 (0.14 mg, 0.05 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC.

- **Yield** : 72% (HPLC)
- **RP-HPLC**: RT = RT = 8.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **SM (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₆₄₈H₁₀₃₈N₁₇₄O₂₇₆S₂: 15746.2; found:

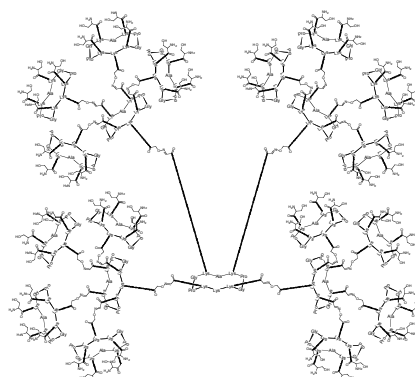


= ISQAVHAAHAEINEAGRSIINFEKLC-
(peptide OVA)

RRR(Ser)₆₄-(NH₂) 165

Aldehyde-containing compound derived from compound 146 (5.0 mg, 0.78 μ mol) was dissolved in 0.1% TFA in water (10 mM) and R(Ser)₄(ONH₂) 144 (35.7 mg, 24.8 μ mol) was added. The solution was stirred for 1h at 37°C. The crude mixture was purified by preparative HPLC to give compound 165 (20.3 mg, 0.69 μ mol).

- **Yield** : 89%
- **RMN ¹H** (400 MHz, D₂O): δ = 7.78 (bs, 20xH_{ox}), 4.76-4.65 (m, 20xCH₂O), 4.49-4.13 (m, 105xH _{α} Lys, 21xH _{α} Ala, 42xH _{α} Gly, 42xH _{α} Pro, 64xH _{α} Ser), 4.16-4.08 (m, 64xH _{β} Ser), 4.06-3.60 (m, 42xH _{α'} Gly, 42xH _{δ} Pro), 3.37-3.18 (m, 104xH _{ϵ} Lys), 3.03 (bt, 1xH _{ϵ} Lys), 2.41-2.28 (m, 42xH _{β} Pro), 2.17-1.23 (m, 21xH _{β} Ala, 42H _{η} Pro, 105xH _{β} Lys, 105xH _{δ} Lys, 105xH _{η} Lys).
- **RP-HPLC**: RT = 9.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)



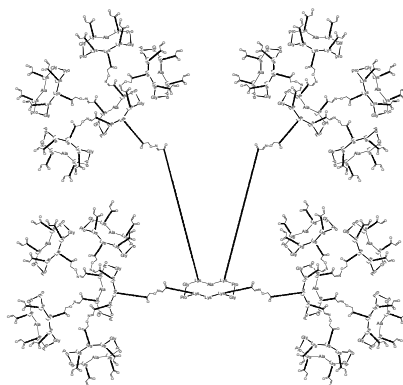
RRR(CHO)₆₄-(NH₂) 166

Compound 165 (4.4 mg, 0.15 μ mol) was dissolved in water (10^{-2} M) and NaIO₄ (20.6 mg, 96.4 μ mol) was added. The solution was stirred at room temperature for 30 min. The product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide as a white powder after freeze-drying (3.6 mg, 0.13 μ mol).

□ **Yield** : 88%

□ **RMN ¹H** (400 MHz, D₂O): δ = 7.78 (s, 20xH_{ox}), 5.33-5.30 (m, 64xCH(OH)₂), 4.77-4.68 (m, 20xCH₂O), 4.49-4.27 (m, 105xH _{α} Lys), 21xH _{α} Ala, 42xH _{α} Pro), 4.20-4.10 (d, J = 16.7 Hz, 42xH _{α} Gly), 3.95-3.62 (m, 42xH _{α'} Gly, 42xH _{δ} Pro), 3.35-3.18 (m, 104xH _{ϵ} Lys), 3.03 (bt, 1xH _{ϵ} Lys), 2.39-2.28 (m, 42xH _{β} Pro), 2.18-1.28 (m, 21xH _{β} Ala, 42H _{η} Pro, 105xH _{β} Lys, 105xH _{δ} Lys, 105xH _{η} Lys).

□ **RP-HPLC**: RT = 9.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)



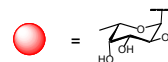
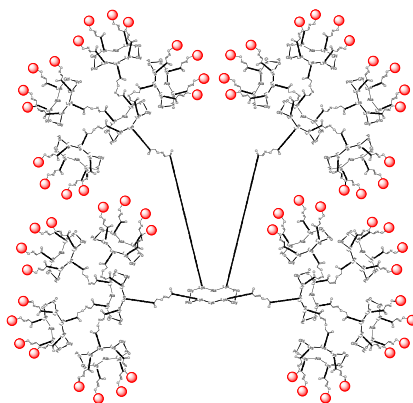
RRR(α Fuc)₆₄-(NH₂) 167

Aldehyde-containing compound derived from 166 (2.1 mg, 77.1 nmol) and aminoxy fucose (1.8 mg, 9.87 μ mol) were dissolved in 0.1% TFA in water (10 mM). After stirring for 1h at 37°C, the crude mixture was purified by preparative HPLC to give after freeze-drying the glycodendrimer 167 as a flocculent powder (2.4 mg, 65.5 nmol).

□ **Yield** : 85%

□ **RMN ¹H** (400 MHz, D₂O): δ = 7.82-7.73 (m, 84xH_{ox}), 5.61-5.55 (m, 64xH-1Fuc), 4.73-4.63 (m, 20xCH₂O), 4.47-4.20 (m, 105xH _{α} Lys, 21xH _{α} Ala, 42xH _{α} Pro), 4.15-3.59 (m, 42xH _{α} Gly, 42xH _{α'} Gly, 42xH _{δ} Pro, 64xH-2Fuc, 64xH-3Fuc, 64xH-4Fuc, 64xH-5Fuc), 3.35-3.16 (m, 104xH _{ϵ} Lys), 3.00 (t, 1xH _{ϵ} Lys), 2.35-2.24 (m, 42xH _{β} Pro), 2.13-1.24 (m, 21xH _{β} Ala, 42H _{η} Pro, 105xH _{β} Lys, 105xH _{δ} Lys, 105xH _{η} Lys), 1.23-1.16 (d, J = 6.0 Hz, 64xCH-3Fuc).

□ **RP-HPLC**: RT = 9.0 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)



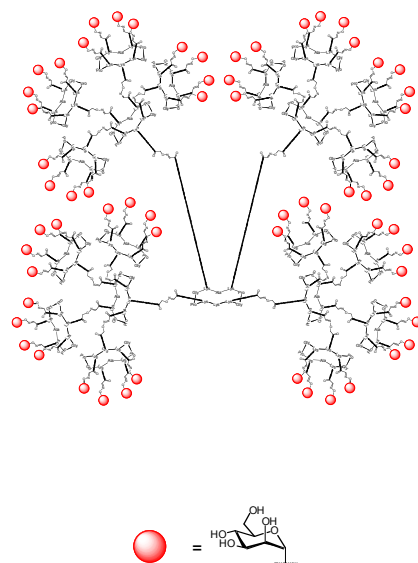
RRR(α Man)₆₄-(NH₂) **168**

The compound **168** was obtained following the procedure of synthesis of **167** (2.1 mg, 57.9 μ mol).

□ **Yield** : 83%

□ **RMN ¹H** (400 MHz, D₂O): δ = 7.82-7.76 (m, 84xH_{ox}), 5.59-5.50 (m, 64xH_{1Man}), 4.77-4.70 (m, 20xCH₂O), 4.50-4.27 (m, 105xH _{α} Lys, 21xH _{α} Ala, 42xH _{α} Pro), 4.18-4.10 (m, 42xH _{α} Gly, 64xH-2Man), 3.93-3.60 (m, 42xH _{α'} Gly, 42xH _{δ} Pro, 64xH-3Man, 64xH-4Man, 64xH-5Man, 64xH-6Man, 64xH-6'Man), 3.38-3.20 (m, 104xH _{ϵ} Lys), 3.03 (bt, 1xH _{ϵ} Lys), 2.39-2.28 (m, 42xH _{β} Pro), 2.18-1.27 (m, 21xH _{β} Ala, 42H _{η} Pro, 105xH _{β} Lys, 105xH _{δ} Lys, 105xH _{η} Lys).

□ **RP-HPLC**: RT = 8.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)



VI.B. Heteroclusters

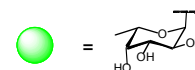
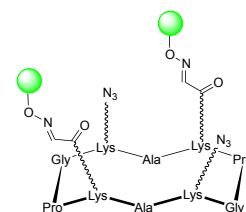
$R(\text{Fuc})_2\text{Oxime}-(\text{N}_3)_2$

A solution of $R(\text{CHO})_2-(\text{N}_3)_2$ (4.0 mg, 3.4 μmol) and aminoxy fucose (2.6 mg, 14.2 μmol) was stirred at 37 °C in 0.1% TFA in H_2O (400 μL). After 3 h, analytical HPLC revealed the total conversion of $R(\text{CHO})_2\text{Ox}-(\text{N}_3)_2$ into $R(\text{Fuc})_2\text{Ox}-(\text{N}_3)_2$. After the addition of acetone (100 μL) to the crude, the reaction mixture was lyophilized.

□ **RP-HPLC:** RT = 9.3 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS):**

m/z calcd for $C_{60}H_{96}N_{20}O_{22}Na$: 1471.7; found: 1471.8 $[M+Na]^+$



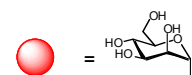
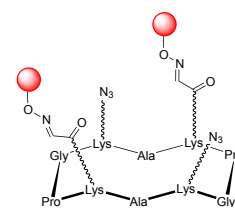
$R(\text{Man})_2\text{Oxime}-(\text{N}_3)_2$

Compound $R(\text{Man})_2\text{Ox}-(\text{N}_3)_2$ was obtained using the same procedure for $R(\text{Fuc})_2\text{Ox}-(\text{N}_3)_2$.

□ **RP-HPLC:** RT = 9.1 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS):**

m/z calcd for $C_{60}H_{97}N_{20}O_{24}$: 1481.7; found: 1481.9 $[M+H]^+$



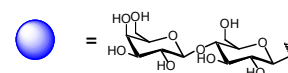
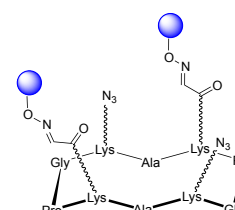
$R(\text{Lac})_2\text{Oxime}-(\text{N}_3)_2$

Compound $R(\text{Lac})_2\text{Ox}-(\text{N}_3)_2$ was obtained using the same procedure for $R(\text{Fuc})_2\text{Ox}-(\text{N}_3)_2$.

□ **RP-HPLC:** RT = 8.9 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS):**

m/z calcd for $C_{72}H_{117}N_{20}O_{34}$: 1805.8; found: 1806.0 $[M+H]^+$



R(Fuc)₂Oxime-(Man)₂Triazole

The crude **R(αFuc)₂Ox-(N₃)₂** was resuspended with *t*-BuOH/AcNH₄ 100 mM pH 7.4 (500 μL, 1:1), propargyl glycoside (4.0 mg, 10.5 μmol) and copper micropowder (455 μg, 7.0 μmol) were next added to the solution and the resulting mixture was left under stirring at room temperature. After 4 h, copper was removed by centrifugation and the supernatant purified by semipreparative HPLC (6.6 mg, 3.5 μmol).

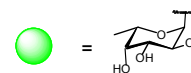
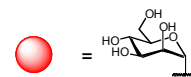
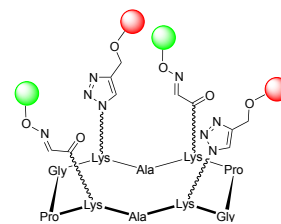
□ **Yield** : 98%

□ **RMN ¹H** (400 MHz, D₂O) δ = 8.07 (s, 1H, **Htrz**), 8.06 (s, 1H, **Htrz**), 7.81 (s, 1H, **Hox**), 7.80 (s, 1H, **Hox**), 5.62 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, **H_{1Fuc}**), 5.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, **H_{1Fuc}**), 4.99 (bs, 2H, 2x**H-1Man**), 4.86–4.68 (m, 6H, 2x**H_{αLys/Nle}**, 2x**CH₂-propargyl**), 4.47–4.35 (m, 10H, 2x**H_{αLys/Nle}**, 2x**CH_{2-εNle}**, 2x**H_{αAla}**, 2x**H_{αPro}**), 4.16–3.63 (m, 28H, 2x**CH_{2-αGly}**, 2x**CH_{2-δPro}**, 2x**H-2Fuc**, 2x**H-3Fuc**, 2x**H-4Fuc**, 2x**H-5Fuc**, 2x**H-2Man**, 2x**H-3Man**, 2x**H-4Man**, 2x**H-5Man**, 2x**CH_{2-6Man}**), 3.36–3.20 (m, 4H, 4**H_{δLys}**), 2.39–2.29 (m, 2H, 2**H_{βPro}**), 2.16–1.27 (m, 36H, 4x**CH_{2-βLys/Nle}**, 4x**CH_{2-δLys/Nle}**, 4x**CH_{2-γLys/Nle}**, 2x**H_{βPro}**, 2x**CH_{2-γPro}**, 2x**CH_{3-Ala}**), 1.22 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, 2x**CH_{3-Fuc}**)

□ **RP-HPLC**: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

m/z calcd for C₇₈H₁₂₄N₂₀O₃₄: 1885.9; found: 1886.0 [M+H]⁺



R(Fuc)₂Oxime-(Lac)₂Triazole

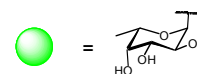
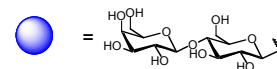
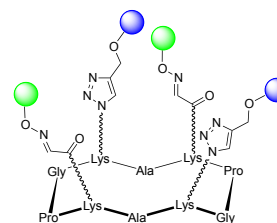
Compound **R(Fuc)₂Oxime-(Lac)₂Trz** (7.6 mg, 3.5 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)₂Ox-(Man)₂Trz**.

□ **Yield** : 98%

□ **RP-HPLC**: RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

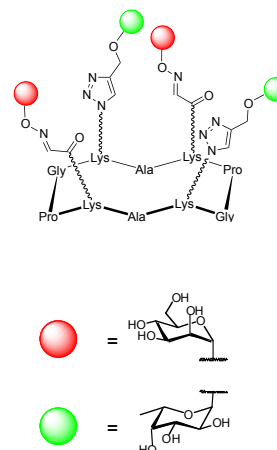
m/z calcd for C₉₀H₁₄₅N₂₀O₄₄: 2210.0; found: 2210.3 [M+H]⁺



R(Man)₂Oxime-(Fuc)₂Triazole

Compound **R(Man)₂Ox-(Fuc)₂Trz** (5.5 mg, 2.9 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)₂Ox-(Man)₂Trz**.

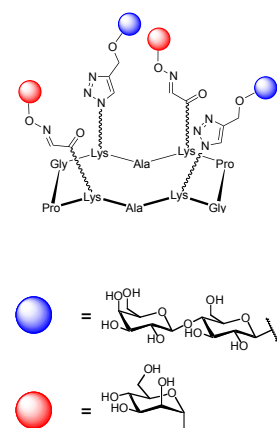
- Yield : 83%
- RP-HPLC: RT = 7.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₇₈H₁₂₄N₂₀O₃₄: 1885.9; found: 1886.0 [M+H]⁺



R(Man)₂Oxime-(Lac)₂Triazole

Compound **R(Man)₂Ox-(Lac)₂Trz** (7.8 mg, 3.5 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)₂Ox-(Man)₂Trz**.

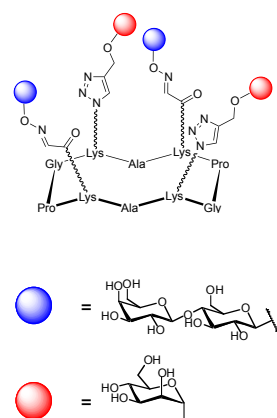
- Yield : 99%
- RP-HPLC: RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₉₀H₁₄₅N₂₀O₄₆: 2242.9; found: 2242.3 [M+H]⁺



R(Lac)₂Oxime-(Man)₂Triazole

Compound **R(Lac)₂Ox-(Man)₂Trz** (7.5 mg, 3.3 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)₂Ox-(Man)₂Trz**.

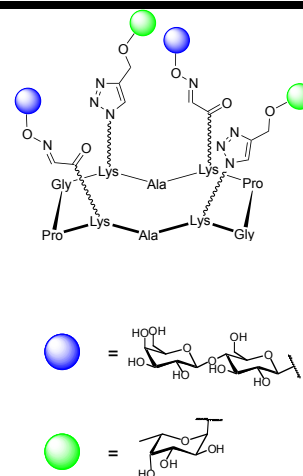
- Yield : 94%
- RP-HPLC: RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₉₀H₁₄₅N₂₀O₄₆: 2242.9; found: 2242.2 [M+H]⁺



R(Lac)₂Oxime-(Fuc)₂Triazole

Compound **R(Lac)₂Ox-(Fuc)₂Trz** (7.3 mg, 3.3 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)₂Ox-(Man)₂Trz**.

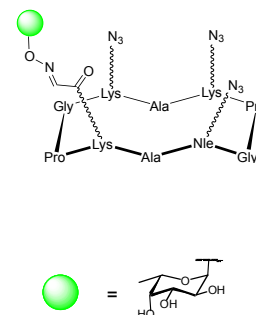
- Yield : 93%
- RP-HPLC: RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₉₀H₁₄₅N₂₀O₄₄: 2210.0; found: 2210.3 [M+H]⁺



R(Fuc)Oxime-(N₃)₃

A solution of **R(CHO)₁-(N₃)₃** (6.6 mg, 5.9 μmol) and aminoxy fucose (2.2 mg, 1.2 μmol) was stirred at 37 °C in 0.1% TFA in H₂O (600 μL). After 3 h, analytical HPLC revealed the total conversion of **R(CHO)₁-(N₃)₃** into the corresponding monovalent intermediate. After the addition of acetone (100 μL) to the crude, the reaction mixture was lyophilized.

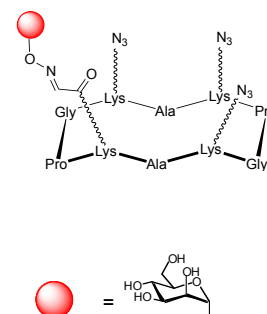
- RP-HPLC: RT = 10.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- Ms (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₅₂H₈₄N₂₁O₁₆: 1258.6; found: 1258.8 [M+H]⁺



R(Man)Oxime-(N₃)₃

Compound **R(Man)Ox-(N₃)₃** was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(N₃)₃**.

- RP-HPLC: RT = 10.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₅₂H₈₄N₂₁O₁₇: 1274.6; found: 1274.8 [M+H]⁺



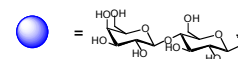
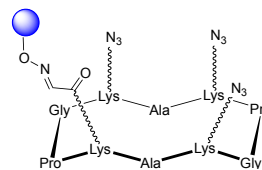
R(Lac)Oxime-(N₃)₃

Compound **R(Lac)Ox-(N₃)₃** was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(N₃)₃**.

□ **RP-HPLC**: RT = 10.2 min (C18, 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

m/z calcd for C₅₈H₉₄N₂₁O₂₂: 1436.7; found: 1436.9 [M+H]⁺



R(Fuc)Oxime-(Man)₃Triazole

The crude **R(Fuc)Ox-(N₃)₃** was then resuspended with *t*-BuOH/AcNH₄ 100 mM pH 7.4 (600 μL, 1:1), propargyl glycoside (10 mg, 27 μmol) and copper micro-powder (600 μg, 10 μmol) were next added to the solution and the resulting mixture was left under stirring at room temperature. After 4 h, copper was removed by centrifugation and the supernatant purified by semipreparative HPLC (10.5 mg, 5.5 μmol).

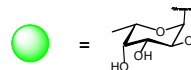
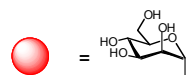
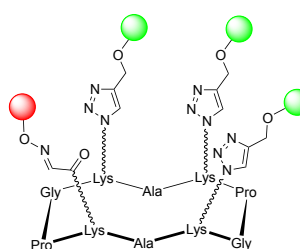
□ **Yield** : 91%

□ **RMN ¹H** (400 MHz, D₂O) δ = 8.05 (s, 1H, **Htrz**), 8.02 (s, 2H, **Htrz**), 7.79 (s, 1H, **Hox**), 5.61 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, **H-1Fuc**), 5.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, **H-1Fuc**), 4.99 (bs, 3H, 3x**H-1Man**), 4.85–4.66 (m, 8H, 2x**H_αLys/Nle**, 3x**CH₂propargyl**), 4.48–4.32 (m, 12H, 2x**H_αLys/Nle**, 3x**CH_{2-ε}Nle**, 2x**H_αAla**, 2x**H_αPro**), 4.15–3.64 (m, 30H, 2x**CH_{2α}Gly**, 2x**CH_{2δ}Pro**, **H-2Fuc**, **H-3Fuc**, **H-4Fuc**, **H-5Fuc**, 3x**H-2Man**, 3x**H-3Man**, 3x**H-4Man**, 3x**H-5Man**, 3x**CH_{2-6Man}**), 3.29–3.19 (m, 2H, 2x**H_εLys**), 2.40–2.30 (m, 2H, 2x**H_βPro**), 2.15–1.28 (m, 36H, 4x**CH_{2β}Lys/Nle**, 4x**CH_{2δ}Lys/Nle**, 4x**CH_{2γ}Lys/Nle**, 2x**H_βPro**, 2x**CH_{2γ}Pro**, 2x**CH_{3Ala}**), 1.22 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, **CH_{3Fuc}**).

□ **RP-HPLC**: RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

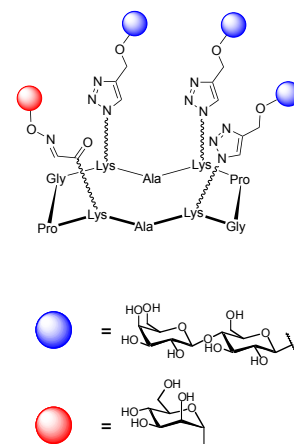
m/z calcd for C₇₉H₁₂₆N₂₁O₃₄: 1912.9; found: 1913.2 [M+H]⁺



R(Fuc)Oxime-(Lac)₃Triazole

Compound **R(Fuc)Ox-(Lac)₃Trz** (13.0 mg, 5.4 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(Man)₃Trz**.

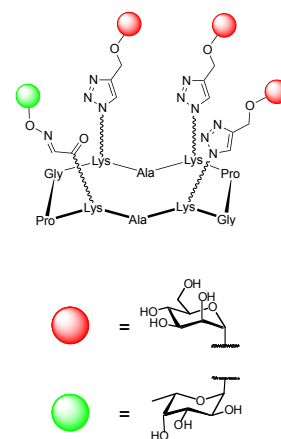
- Yield : 90%
- RP-HPLC: RT = 7.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₉₇H₁₅₆N₂₁O₄₉: 2400.0; found: 2399.3 [M+H]⁺



R(Man)Oxime-(Fuc)₃Triazole

Compound **R(Man)Ox-(Fuc)₃Trz** (9.6 mg, 5.1 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(Man)₃Trz**.

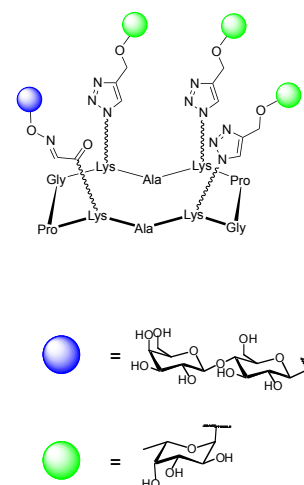
- Yield : 85%
- RP-HPLC: RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₇₉H₁₂₆N₂₁O₃₂: 1880.9; found: 1881.1 [M+H]⁺



R(Lac)Oxime-(Man)₃Triazole

Compound **R(Lac)Ox-(Man)₃Trz** (11.2 mg, 5.3 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(Man)₃Trz**.

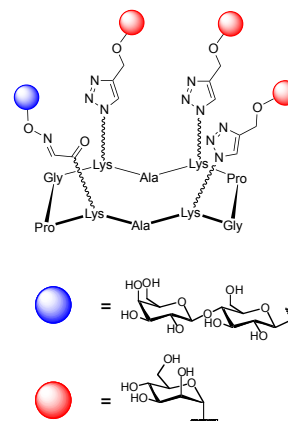
- Yield : 89%
- RP-HPLC: RT = 7.5 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₈₅H₁₃₆N₂₁O₄₀: 2092.0; found: 2091.2 [M+H]⁺



R(Lac)Oxime-(Fuc)₃Triazole

Compound **R(Lac)Ox-(Fuc)₃Trz** (11.2 mg, 5.5 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(Man)₃Trz**.

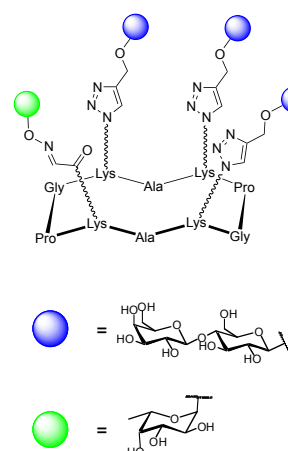
- Yield : 91%
- RP-HPLC: RT = 7.83 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS): C₈₅H₁₃₆N₂₁O₃₇
m/z calcd for C₉₀H₁₄₅N₂₀O₄₄: 2043.9; found: 2043.1 [M+H]⁺



R(Man)Oxime-(Lac)₃Triazole

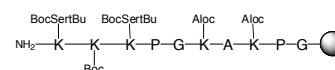
Compound **R(Man)Ox-(Lac)₃Trz** (12.6 mg, 5.2 μmol) was obtained using the same procedure for **R(Fuc)Ox-(Man)₃Trz**.

- Yield : 87%
- RP-HPLC: RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₉₇H₁₅₆N₂₁O₅₀: 2415.0; found: 2415.4 [M+H]⁺



R(BocSer^tBu)₂(Aloc)₂-(Boc) linear **241**

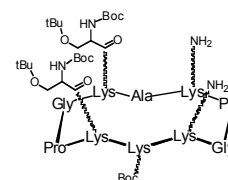
The linear decapeptide was assembled on Gly-Sasrin® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure A and modified amino acid **106**.



R(BocSer^tBu)₂(NH₂)₂-(Boc) **243**

After cleavage on the resin following procedure B, the linear decapeptide **241** was first cyclised using general procedure C and the Aloc protecting group was removed following procedure D2.

- RP-HPLC: RT = 16.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₇₆H₁₃₆N₁₇O₂₀: 1607.0; found: 1607.6 [M+H]⁺



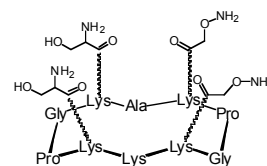
R(Ser)₂(ONH₂)₂-(NH₂) **244**

The cyclodecapeptide R(BocSertBu)₂(NH₂)₂-(Boc) **243** (19.4 mg, 12.1 μmol) was dissolved in 485 μL of DMF, then BocAaaONHS **142** (13.9 mg, 48.3 μmol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 1h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling and the mixture was evaporated. The protecting group Boc/tBu were removed using the general procedure [D1](#). Then the crude was evaporated and purified by RP-HPLC.

□ **RP-HPLC**: RT = 6.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

m/z calcd for C₅₇H₁₀₂N₁₉O₁₈: 1340.7; found: 1340.5 [M+H]⁺



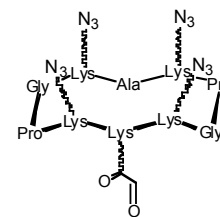
R(N₃)₄-(CHO) **248**

The cyclodecapeptide R(N₃)₄(NH₂) **113** (9.7 mg, 8.6 μmol) was dissolved in 500 μL of DMF, BocSer(tBu)-NHS **105** (6.2 mg, 17.2 μmol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling and the mixture was evaporated. After, the protecting group Boc/tBu was removed using the general procedure [D1](#) and the cyclodecapeptide was oxidized with sodium periodate using the general procedure [E](#) and then directly purified by RP-HPLC (7.2 mg, 6.1 μmol).

□ **RP-HPLC**: RT = 12.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

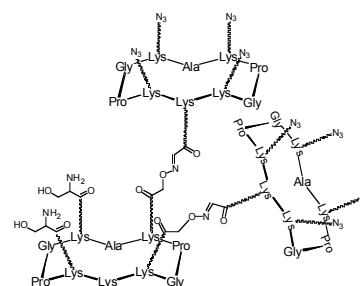
m/z calcd for C₄₉H₇₈N₂₃O₁₂: 1180.6; found: 1180.6 [M+H]⁺



$R(\text{Ser})_2(R(\text{N}_3)_4)_2-(\text{NH}_2)$ **249**

$R(\text{Ser})_2(\text{ONH}_2)_2-(\text{NH}_2)$ **244** (5.1 mg, 3.8 nmol) and $R(\text{N}_3)_4-(\text{CHO})$ **248** (17.9 mg, 15.2 μmol) were assembled using procedure F to give after purification and freeze-drying the compound **249** as a flocculent powder (12.9 mg, 3.5 nmol).

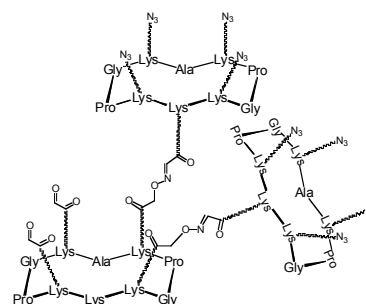
- **Yield** : 93%
- **RP-HPLC**: RT = 13.9 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $\text{C}_{155}\text{H}_{251}\text{N}_{65}\text{O}_{40}$: 3665.1; found: 3665.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$



$R(\text{CHO})_2(R(\text{N}_3)_4)_2-(\text{NH}_2)$ **250**

Compound **249** $R(\text{Ser})_2(R(\text{N}_3)_4)_2-(\text{NH}_2)$ (5.7 mg, 1.5 μmol) was dissolved in a mixture $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:7) (10^{-2}M) and NaIO_4 (6.6 mg, 31.1 μmol) was added. The solution was stirred at room temperature for 30 min. The product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide **250** as a white powder after freeze-drying (4.8 mg, 1.3 μmol).

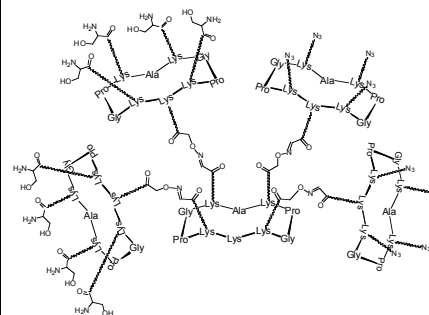
- **Yield** : 86%
- **RP-HPLC**: RT = 14.2 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $\text{C}_{153}\text{H}_{241}\text{N}_{63}\text{O}_{40}$: 3602.9; found: 3602.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$



R(R(Ser)₄)₂(R(N₃)₄)₂-(NH₂) 251

R(CHO)₂(R(N₃)₂)₄-(NH₂) 250 (4.8 mg, 1.3 μmol) and R(Ser)₄-(ONH₂) 144 (7.7 mg, 5.3 μmol) were dissolved in a mixture CH₃CN/H₂O (3:7) containing 0.1% TFA (10 mM). After stirring for 1h at 37°C the crude mixture was purified by preparative HPLC to give after freeze-drying the scaffold 251 as a flocculent powder (6.8 mg, 1.1 μmol).

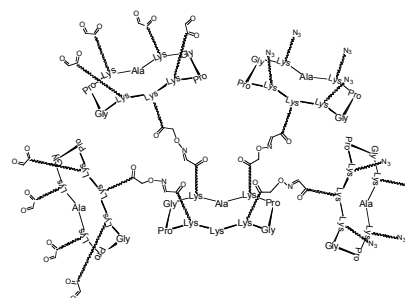
- **Yield** : 79%
- **RP-HPLC**: RT = 12.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₂₇₅H₄₅₃N₁₀₃O₇₈: 6450.2; found: 6449.5 [M+H]⁺



R(R(CHO)₄)₂(R(N₃)₄)₂-(NH₂) 252

Compound R(R(Ser)₄)₂(R(N₃)₄)₂-(NH₂) 251 (3.4 mg, 0.53 μmol) was dissolved in a mixture CH₃CN/H₂O (3:7) (10⁻²M) and NaIO₄ (9.0 mg, 42.2 μmol) was added. The solution was stirred at room temperature for 30 min. The product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide as a white powder after freeze-drying (2.7 mg, 0.44 μmol).

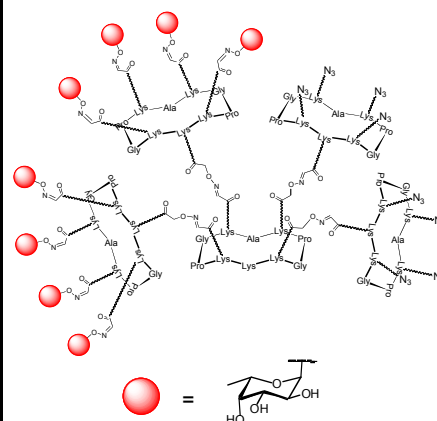
- **Yield** : 83%
- **RP-HPLC**: RT = 13.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₂₆₇H₄₁₃N₉₅O₇₈: 6201.1; found: 6201.1 [M+H]⁺



R(R(α Fuc)₄)₂(R(N₃)₄)₂-(NH₂) 253

Compound 253 (1.9 mg, 0.25 nmol) was obtained following general procedure F.

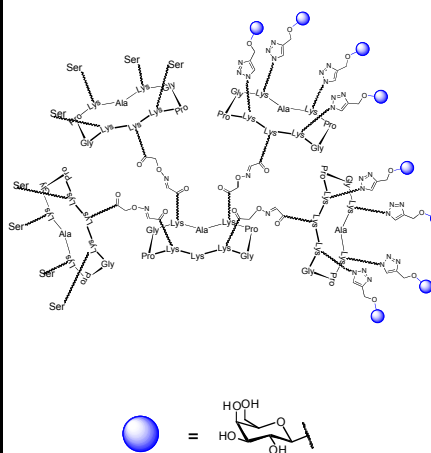
- Yield :91%
- RP-HPLC: RT = 13.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₃₁₅H₅₀₁N₁₀₃O₁₁₀: 7490.7; found: 7490.9 [M+H]⁺



R(R(Ser)₄)₂(R(β Gal)₄)₂-(NH₂) 254

Compound 254 (1.3 mg, 0.16 μ mol) was obtained following general procedure G.

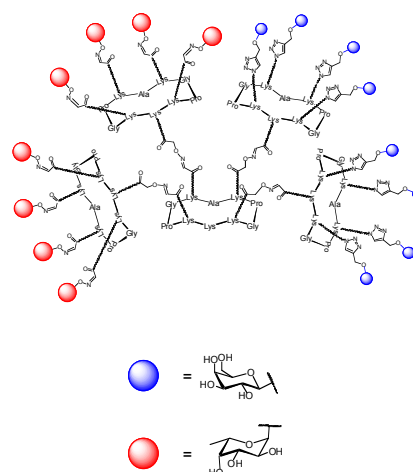
- Yield : 79%
- RP-HPLC: RT = 8.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₃₄₇H₅₆₅N₁₀₃O₁₂₆: 8195.1; found: 8195.0 [M+H]⁺



R(R(α Fuc)₄)₂(R(β Gal)₄)₂-(NH₂)

Compound R(R(α Fuc)₄)₂(R(β Gal)₄)₂-(NH₂) (1.4 mg, 0.15 μ mol) was obtained following general procedure G.

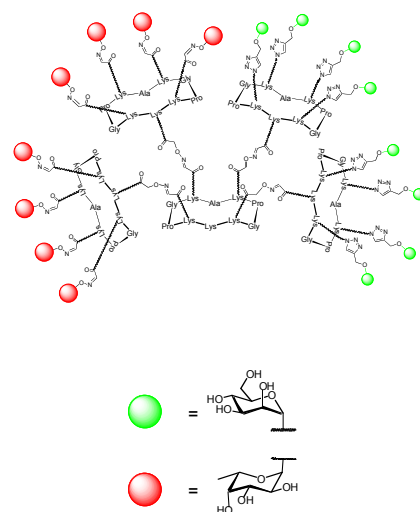
- Yield : 81%
- RP-HPLC: RT = 8.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₃₈₇H₆₁₃N₁₀₃O₁₅₈: 9236.3; found: 9236.3 [M+H]⁺



$R(R(\alpha\text{Fuc})_4)_2(R(\alpha\text{Man})_4)_2-(\text{NH}_2)$

Hydrated aldehyde-containing cyclopeptide **252** (4.5 mg, 0.72 μmol) and aminoxy sugar (1.6 mg, 8.7 μmol) were dissolved in 0.1% TFA in H_2O (10 mM). After stirring for 30 min at room temperature, the propargyl glycosides (5.1 mg, 23.2 μmol) dissolved in DMF (1 mL) and a solution of CuSO_4 (1.4 mg, 5.8 μmol) in PBS buffer (500 μL , 100 mM) were added. Then was added a solution of THPTA (10.1 mg, 23.2 μmol) and sodium ascorbate (5.1 mg, 40.1 μmol) in PBS buffer (500 μL , 100 mM). All solutions were previously degassed under argon. The reaction was stirred at room temperature under argon and after 1h analytical HPLC indicate complete reaction coupling. Then Chelex resin was added to remove excess of copper and the reaction mixture was directly purified by RP-HPLC affording pure compound as a white powder (5.6 mg, 0.61 μmol).

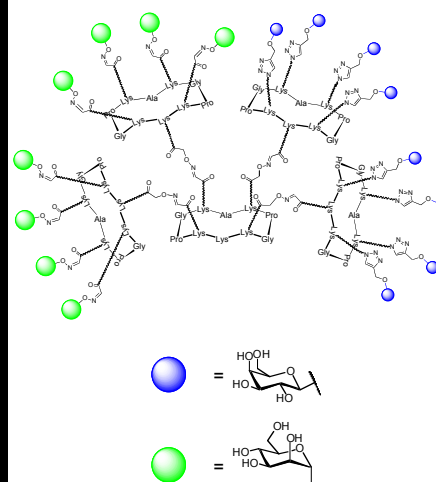
- **Yield** : 84%
- **RP-HPLC**: RT = 8.1 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $\text{C}_{387}\text{H}_{613}\text{N}_{103}\text{O}_{158}$: 9236.3; found: 9236.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$



$R(R(\alpha\text{Man})_4)_2(R(\beta\text{Gal})_4)_2-(\text{NH}_2)$

Compound $R(R(\alpha\text{Man})_4)_2(R(\beta\text{Gal})_4)_2-(\text{NH}_2)$ (3.1 mg, 0.33 μmol) was obtained using the same procedure for $R(R(\alpha\text{Fuc})_4)_2(R(\alpha\text{Man})_4)_2-(\text{NH}_2)$.

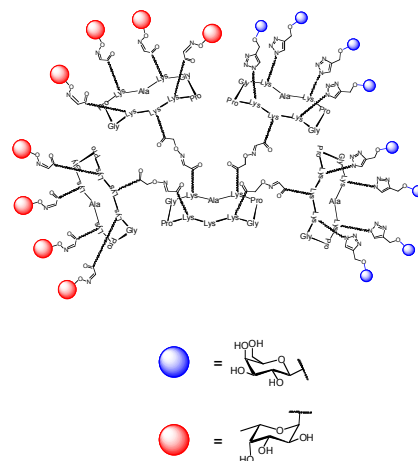
- **Yield** : 76%
- **RP-HPLC**: RT = 7.9 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
Cal m/z calcd for $\text{C}_{390}\text{H}_{619}\text{N}_{103}\text{O}_{163}$: 9358.4; found: 9358.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$



R(R(β Gal)₄)₂(R(α Fuc)₂)-(NH₂)

Compound **R(R(β Gal)₄)₂(R(α Fuc)₄)₂-(NH₂)** (3.5 mg, 0.38 μ mol) was obtained using the same procedure for **R(R(α Fuc)₄)₂(R(α Man)₄)₂-(NH₂)**.

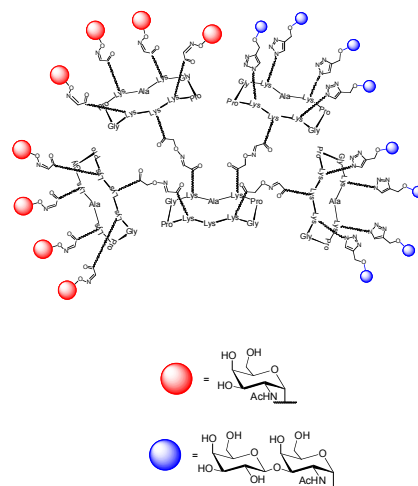
- Yield : 77%
- RP-HPLC: RT = 8.0 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₃₈₇H₆₁₃N₁₀₃O₁₅₈: 9236.3; found: 9235.9 [M+H]⁺



R(R(α Tn)₄)₂(R(α TF)₄)₂-(NH₂) 257

Compound **257** (4.4 mg, 0.39 μ mol) was obtained using the same procedure for **R(R(α Fuc)₄)₂(R(α Man)₄)₂-(NH₂)**.

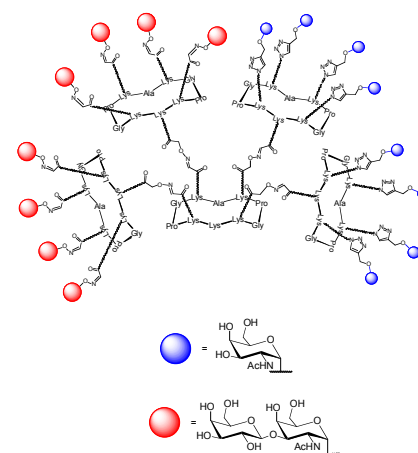
- Yield : 76%
- RP-HPLC: RT = 7.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS):
m/z calcd for C₄₆₇H₇₄₂N₁₁₉O₂₀₆: 11319.1; found: 11319.0 [M+H]⁺



R(R(α TF)₄)₂(R(α Tn)₄)₂-(NH₂) 258

Compound **258** (4.5 mg, 0.4 μ mol) was obtained using the same procedure for **R(R(α Fuc)₄)₂(R(α Man)₄)₂-(NH₂)**.

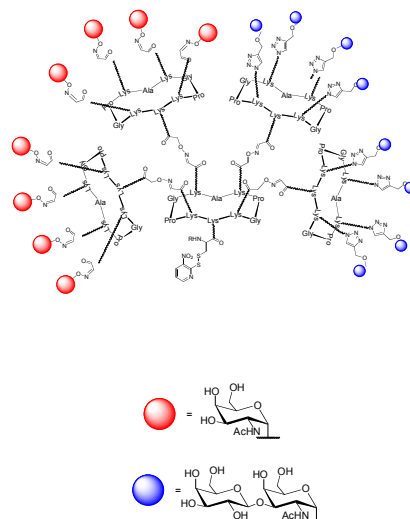
- Yield : 71%
- RP-HPLC: RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- MS (ESI⁺-MS): C₄₆₇H₇₄₂N₁₁₉O₂₀₆
m/z calcd for C₃₇₉H₆₀₇N₉₅O₁₅₈: 11319.1; found: 11318.7 [M+H]⁺



R(R(α Tn)₄)₂(R(α TF)₄)₂-(NPys) 259

The glycopeptide **R(R(α Tn)₄)₂(R(α TF)₄)₂-(NH₂) 257** (2.5 mg, 0.22 μ mol) was dissolved in 150 μ L of DMSO, then BocNPys-NHS **128** (0.21 mg, 0.44 μ mol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling and the Boc protecting group was removed using general procedure **D1**. Finally the mixture was evaporated and purified by RP-HPLC (1.0 mg, 0.09 μ mol).

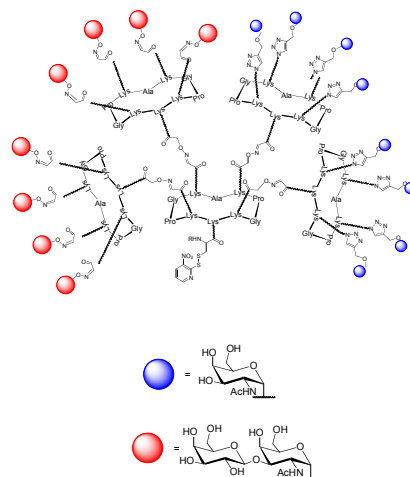
- **Yield** : 41%
- **RP-HPLC**: RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₄₇₅H₇₈₄N₁₂₂O₂₀₉S₂: 11611.4; found: 11611.0 [M+H]⁺



R(R(α TF)₄)₂(R(α Tn)₄)₂-(NPys) 260

Compound **260** (0.86 mg, 0.07 μ mol) was obtained using the same procedure for **259**.

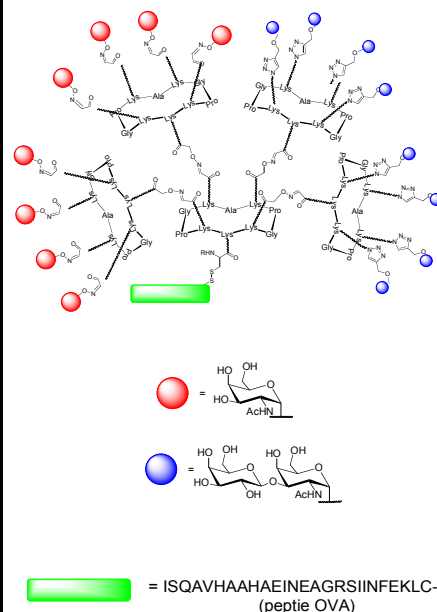
- **Yield** : 40%
- **RP-HPLC**: RT = 7.6 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₄₇₅H₇₈₄N₁₂₂O₂₀₉S₂: 11611.4; found: 11611.3 [M+H]⁺



R(R(α Tn)₄)₂(R(α TF)₄)₂-(OVA) 261

The glycopeptide R(R(α Tn)₄)₂(R(α TF)₄)₂-(NPys) 259 (1.0 mg, 0.09 μ mol) was dissolved in 200 μ L of DMF/PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/argon. Then the peptide OVA 160 (0.25 mg, 0.09 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC.

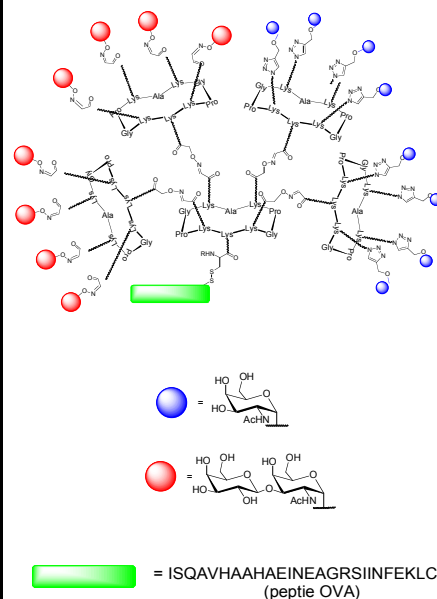
- **Yield** : 75% (HPLC)
- **RP-HPLC**: RT = RT = 7.8 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₅₉₂H₉₄₃N₁₅₈O₂₄₄S₂: 14241.6; found:



R(R(α TF)₄)₂(R(α Tn)₄)₂-(OVA) 262

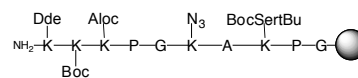
The glycopeptide R(R(α TF)₄)₂(R(α Tn)₄)₂-(NPys) 260 (0.86 mg, 0.07 μ mol) was dissolved in 200 μ L of DMF/PBS (pH 4.8) (1:1) under argon, the O₂ was removed using a cycle vacuum/argon. Then the peptide OVA 160 (0.21 mg, 0.07 μ mol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. under argon and purified by RP-HPLC.

- **Yield** : 75% (HPLC)
- **RP-HPLC**: RT = RT = 7.7 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₅₉₂H₉₄₃N₁₅₈O₂₄₄S₂: 14241.6; found:



R(BocSer(tBu))(N₃)(Aloc)(Dde)-(Boc) linear 222

The linear decapeptide 222 was assembled on Gly-Sasrin® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure A and modified amino acid 106 and 111. Then the peptide was released from the resin using general procedure B.



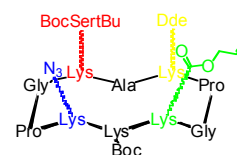
□ **RP-HPLC:** RT = 14.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)

□ **MS (ESI⁺-MS):**

m/z calcd for C₇₈H₁₃₁N₁₈O₂₁: 1656.9; found: 1657.1 [M+H]⁺

R(BocSer(tBu))(N₃)(Aloc)(Dde)-(Boc) 223

The linear decapeptide 222 was cyclised using general procedure C.



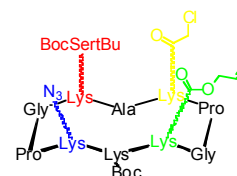
□ **RP-HPLC:** RT = 15.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 25 min)

□ **MS (ESI⁺-MS):**

m/z calcd for C₇₈H₁₂₉N₁₈O₂₀: 1638.9; found: 1639.4 [M+H]⁺

R(BocSer(tBu))(N₃)(Aloc)(Cl)-(Boc) 224

Compound 223 (126 mg, 0.077 mmol) was dissolved in dry DMF (6.1 mL), allyl alcohol (14 μL, 0.38 mmol) and hydrazine monohydrate (126 μL, 0.077 mmol) were added. The solution was stirred at room temperature. Analytical HPLC confirmed the complete conversion. After evaporation, the product was precipitated in diethyl ether. Then the cyclodecapeptide R(BocSer(tBu))(N₃)(Aloc)(NH₂)-(Boc) (15 mg, 10.2 μmol) was dissolved in 5 mL of DMF, chloroacetic anhydride (3.46 mg, 20.4 μmol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 2h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling and the mixture was evaporated and purified by RP-HPLC.



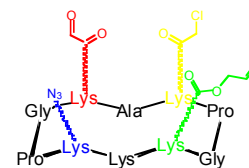
□ **RP-HPLC:** RT = 15.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)

□ **MS (ESI⁺-MS):**

m/z calcd for C₇₀H₁₁₈N₁₈O₁₉Cl: 1549.8; found: 1550.2 [M+H]⁺

R(CHO)(N₃)(Aloc)(Cl)-(NH₂) 225

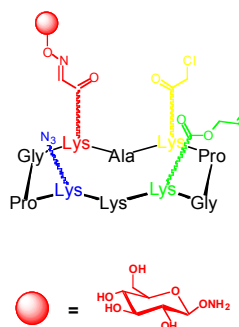
First the protecting group Boc/tBu were removed following the general procedure D1 and then the cyclodecapeptide R(Ser)(N₃)(Aloc)(Cl)-(NH₂) (9.1 mg, 5.9 μmol) was oxidized using general procedure E (7.1 mg, 5.5 μmol).



- **Yield** : 94%
- **RP-HPLC**: RT = 10.4 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₅₅H₉₁N₁₇O₁₆Cl (hydrated): 1280.6; found: 1280.7 [M+H]⁺

R(βGlc)ox(N₃)(Aloc)(Cl)-(NH₂) 227

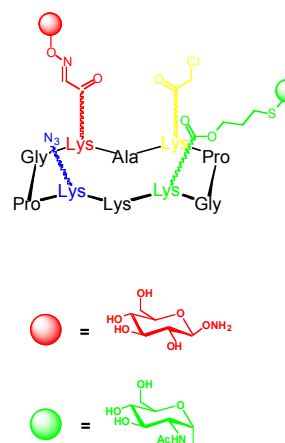
The glycopeptide 227 was obtained using general procedure F (9.5 mg, 6.6 μmol).



- **Yield** : 87%
- **RP-HPLC**: RT = 9.9 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₆₁H₁₀₀N₁₈O₂₀Cl: 1439.7; found: 1439.8 [M+H]⁺

R(βGlc)ox(N₃)(βGlcNAc)tec(Cl)-(NH₂) 229

The glycopeptide 229 was obtained using general procedure H (7.4 mg, 4.4 μmol).

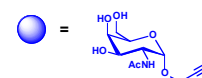
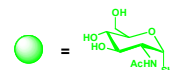
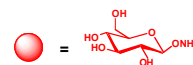
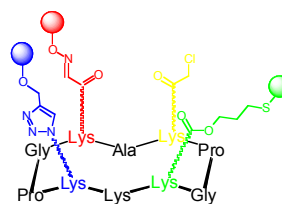


- **Yield** : 67%
- **RP-HPLC**: RT = 9.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₆₉H₁₁₅N₁₉O₂₅SCl: 1676.8; found: 1676.9 [M+H]⁺

R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(Cl)-(NH₂) 230

The glycopeptide 230 was obtained using general procedure G2 (7.2 mg, 3.7 μ mol).

- **Yield** : 85%
- **RP-HPLC**: RT = 8.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₈₀H₁₃₂N₂₀O₃₁SCl: 1935.9; found: 1936.8 [M+H]⁺

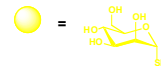
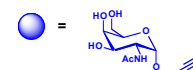
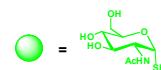
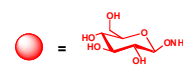
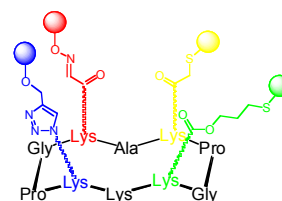


R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc-(NH₂)

232

The glycopeptide R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)ClAc-(NH₂) 232 was obtained using general procedure I (8.5 mg, 3.1 μ mol).

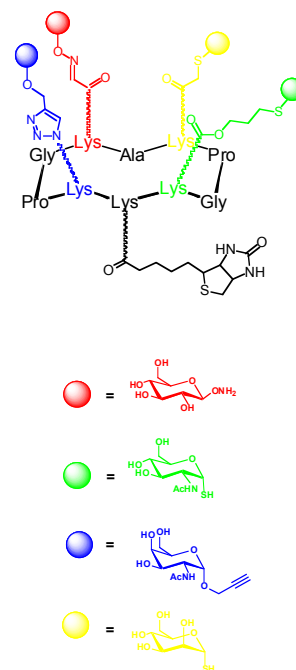
- **Yield** : 84%
- **RP-HPLC**: RT = 8.1 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₈₆H₁₄₃N₂₀O₃₆S₂: 2096.9; found: 2096.9 [M+H]⁺



R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc-(Biotine)**236**

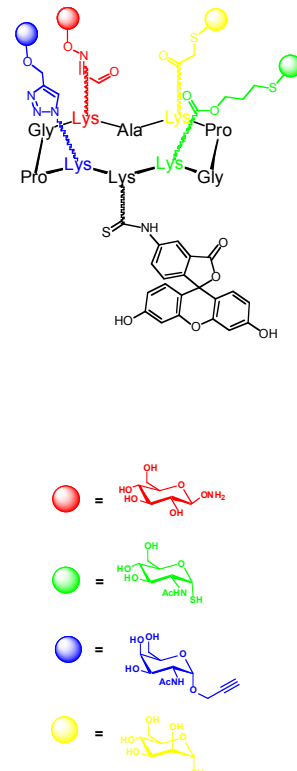
Compound **232** (2.0 mg, 0.95 μ mol) was dissolved in dry DMF (1 mL) and Biotin-OSu **234** (0.48 mg, 1.4 μ mol) was added to the solution. The pH was adjusted at 8 with DIPEA and the solution was stirred at room temperature. After 30 min, the DMF was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was purified by semi-preparative RP-HPLC (1.9 mg, 0.82 μ mol).

- **Yield** : 90%
- **RP-HPLC**: RT = 8.7 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $C_{96}H_{157}N_{22}O_{38}S_3$: 2323.0; found: 2323.0 $[M+H]^+$

**R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc-(FITC)****235**

Compound **232** (3.5 mg, 1.7 μ mol) was dissolved in dry DMF (1.7 mL) and FITC **233** (0.9 mg, 2.5 μ mol) was added to the solution. The pH was adjusted at 8 with DIPEA and the solution was stirred at room temperature. After 30 min, the DMF was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was purified by RP-HPLC (3.5 mg, 1.4 μ mol).

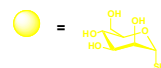
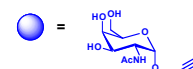
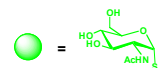
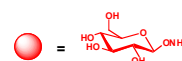
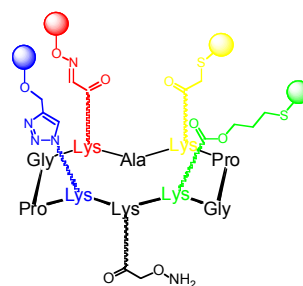
- **Yield** : 85%
- **RP-HPLC**: RT = 10.2 min (C_{18} , 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for $C_{107}H_{154}N_{21}O_{41}S_3$: 2487.0; found: 2487.1 $[M+H]^+$



R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc-(ONH₂)**255**

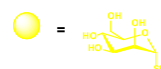
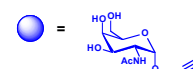
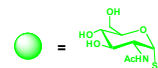
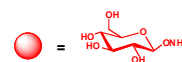
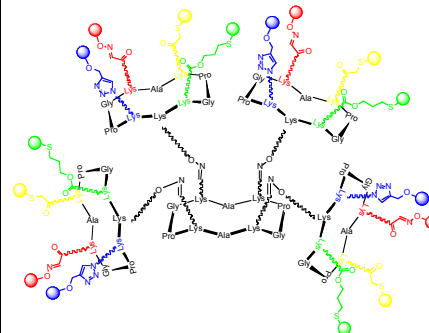
Compound **232** (5.7 mg, 2.7 μ mol) was dissolved in dry DMF (1.1 mL), then BocAoa-OSu **142** (1.2 mg, 4.1 μ mol) was added and the pH was adjusted at 8 using DIPEA. After 1 h, analytical HPLC indicated complete reaction coupling. The DMF was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was precipitated in diethyl ether and subsequently deprotected using procedure **D1**. The resulting aminoxyolated **255** compound was purified by RP-HPLC (5.7 mg, 2.6 μ mol).

- **Yield** : 93%
- **RP-HPLC**: RT = 8.2 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₈₈H₁₄₆N₂₁O₃₈S₂: 2270.0; found: 2169.4 [M+H]⁺

**R(R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc)₄-(Ala)₂****256**

Aldehyde-containing compound R(CHO)₄-(Ala)₂ **110** (0.53 mg, 0.45 μ mol) was dissolved in 0.1% TFA in water (10 mM) and the previous aminoxyolated compound **255** (5.8 mg, 2.7 μ mol) was added. The solution was stirred for 1 h at 37°C and purified by RP-HPLC to obtain compound **256** (3.8 mg, 0.38 μ mol).

- **Yield** : 87%
- **RP-HPLC**: RT = 10.3 min (C₁₈, 214 nm 5-100% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₄₀₄H₆₅₁N₉₈O₁₆₆S₈: 9793.3; found: 9792.8 [M+H]⁺



R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc-(PV1)**238**

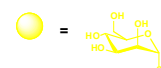
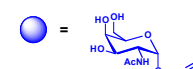
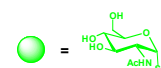
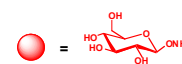
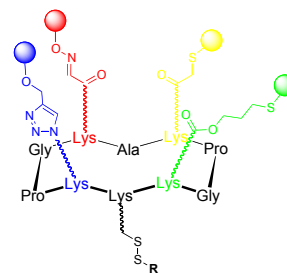
Compound **232** (3.4 mg, 1.6 μ mol) was dissolved in dry DMF (600 μ L) and BocCys(NPys)OSu **128** (1.5 mg, 3.2 μ mol) was added. The pH was adjusted at 8 with DIPEA and the solution was stirred at room temperature. After 1 h, the DMF was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was precipitated in diethyl ether. The crude compound was subsequently treated with a solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/1, 1 mL). After 30 min, the solution was evaporated and the residue purified by semi-preparative RP-HPLC. Compound (3.7 mg, 1.5 μ mol) and the PV peptide **237** (2.8 mg, 1.6 μ mol) were dissolved separately in a mixture of sodium acetate buffer 25 mM pH 5 and DMF (1/1, 1.2 mL). Both solutions were degassed under reduced pressure, mixed together and the reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere. After 1 h, the crude yellow mixture was purified by semi-preparative RP- HPLC to obtain compound **238** as a pure lyophilized powder.

□ **Yield** : 85%

□ **RP-HPLC**: RT = 13.2 min (C₁₈, 260 nm 5-100% B in 20 min)

□ **MS (ESI⁺-MS)**:

m/z calcd for C₁₇₁H₂₇₂N₄₀O₅₆S₄₂: 3911.9; found: 1956.6 [M+2H]²⁺; 1304.9 [M+3H]³⁺; 978.9 [M+4H]⁴⁺; 783.4 [M+5H]⁵⁺

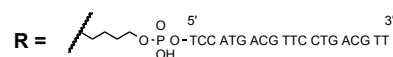
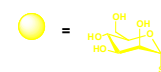
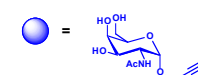
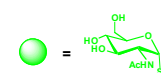
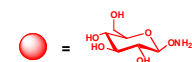
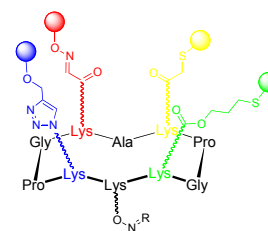


R = H-Lys-Leu-Phe-Ala-Val-Trp-Lys-Ile
-Thr-Tyr-Lys-Asp-Thr-Cys-CONH₂

R(β Glc)ox(α Tn)trz(β GlcNAc)tec(α Man)tcc-(CpG)**240**

To a solution of **239** (0.2 μ mol) in ammonium acetate buffer (200 μ L, 0.4 M, pH 4.6) was added aminoxylated cyclopeptide **255** (0.069 μ mol, 0.15 mg) solubilized in water. The reaction was stirred at room temperature during 4 h and monitored by RP-HPLC. The conjugate **240** was obtained after RP-HPLC purification (0,4 mg, 0.045 μ mol)

- **Yield** : 65%
- **RP-HPLC**: RT = 15.7 min (C₁₈, 260 nm 5-30% B in 20 min)
- **MS (ESI⁺-MS)**:
m/z calcd for C₂₈₇H₃₉₈N₈₈O₁₆₃P₂₀S₂: 8372.0; found: 8372.9 [M+H]⁺



Chapitre VII Bibliographie

- [1] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, *CA: a cancer journal for clinicians* **2012**, *62*, 10-29.
- [2] G. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198-1206.
- [3] T. Ju, G. S. Lanneau, T. Gautam, Y. Wang, B. Xia, S. R. Stowell, M. T. Willard, W. Wang, J. Y. Xia, R. E. Zuna, Z. Laszik, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, R. D. Cummings, *Cancer research* **2008**, *68*, 1636-1646.
- [4] aD. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature reviews. Drug discovery* **2005**, *4*, 477-488; bZ. Yin, X. Huang, *J Carbohydr Chem* **2012**, *31*, 143-186.
- [5] T. Buskas, P. Thompson, G. J. Boons, *Chemical communications* **2009**, 5335-5349.
- [6] S. Bay, T. Freire, *Revue Francophone des Laboratoires* **2006**, *381*, 39-46.
- [7] I. Sutkeviciute, M. Thepaut, S. Sattin, A. Berzi, J. McGeagh, S. Grudinin, J. Weiser, A. Le Roy, J. J. Reina, J. Rojo, M. Clerici, A. Bernardi, C. Ebel, F. Fieschi, *ACS chemical biology* **2014**, *9*, 1377-1385.
- [8] N. Varga, I. Sutkeviciute, R. Ribeiro-Viana, A. Berzi, R. Ramdasi, A. Daggetti, G. Vettoretti, A. Amara, M. Clerici, J. Rojo, F. Fieschi, A. Bernardi, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4175-4184.
- [9] M. Thepaut, C. Guzzi, I. Sutkeviciute, S. Sattin, R. Ribeiro-Viana, N. Varga, E. Chabrol, J. Rojo, A. Bernardi, J. Angulo, P. M. Nieto, F. Fieschi, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 2518-2529.
- [10] C. Guzzi, J. Angulo, F. Doro, J. J. Reina, M. Thepaut, F. Fieschi, A. Bernardi, J. Rojo, P. M. Nieto, *Organic & biomolecular chemistry* **2011**, *9*, 7705-7712.
- [11] T. Buskas, Y. Li, G. J. Boons, *Chemistry* **2004**, *10*, 3517-3524.
- [12] F. Peri, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4543-4556.
- [13] K. Landsteiner, M. W. Chase, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1942**, *49*, 688-690.
- [14] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 1380-1419.
- [15] G. Ragupathi, S. F. Slovin, S. Adluri, D. Sames, I. J. Kim, H. M. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, K. O. Lloyd, H. I. Scher, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 563-566.
- [16] S. F. Slovin, G. Ragupathi, S. Adluri, G. Ungers, K. Terry, S. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, M. Fazzari, L. Dantis, K. Olkiewicz, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, H. I. Scher, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 5710-5715.
- [17] S. J. Danishefsky, V. Behar, J. T. Randolph, K. O. Lloyd, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5701-5711.
- [18] V. Kudryashov, H. M. Kim, G. Ragupathi, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, K. O. Lloyd, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **1998**, *45*, 281-286.
- [19] P. J. Sabbatini, V. Kudryashov, G. Ragupathi, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, W. Bornmann, M. Spassova, A. Zatorski, D. Spriggs, C. Aghajanian, S. Soignet, M. Peyton, C. O'Flaherty, J. Curtin, K. O. Lloyd, *International Journal of Cancer* **2000**, *87*, 79-85.
- [20] S. Cappello, N. X. Liu, C. Musselli, F.-T. Brezicka, P. O. Livingston, G. Ragupathi, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **1999**, *48*, 483-492.
- [21] M. N. Dickler, G. Ragupathi, N. X. Liu, C. Musselli, D. J. Martino, V. A. Miller, M. G. Kris, F. T. Brezicka, P. O. Livingston, S. C. Grant, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **1999**, *5*, 2773-2779.
- [22] I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochemical Society Transactions* **1997**, *25*, 214-219.
- [23] S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12474-12485.

- [24] E. Kagan, G. Ragupathi, S. S. Yi, C. A. Reis, J. Gildersleeve, D. Kahne, H. Clausen, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2005**, *54*, 424-430.
- [25] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 4292-4298.
- [26] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, C. Fernandez, M. Diani, D. Verbel, S. Danishefsky, P. Livingston, H. I. Scher, *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2005**, *54*, 694-702.
- [27] G. Ragupathi, L. Howard, S. Cappello, R. Rao Koganty, D. Qiu, B. M. Longenecker, M. A. Reddish, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **1999**, *48*, 1-8.
- [28] G. Ragupathi, F. Koide, N. Sathyan, E. Kagan, M. Spassova, W. Bornmann, P. Gregor, C. A. Reis, H. Clausen, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2003**, *52*, 608-616.
- [29] P. J. Sabbatini, G. Ragupathi, C. Hood, C. A. Aghajanian, M. Juretzka, A. Iasonos, M. L. Hensley, M. K. Spassova, O. Ouerfelli, D. R. Spriggs, W. P. Tew, J. Konner, H. Clausen, N. Abu Rustum, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2007**, *13*, 4170-4177.
- [30] J. R. Allen, C. R. Harris, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1890-1897.
- [31] G. Ragupathi, D. M. Coltart, L. J. Williams, F. Koide, E. Kagan, J. Allen, C. Harris, P. W. Glunz, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 13699-13704.
- [32] G. Ragupathi, F. Koide, P. O. Livingston, Y. S. Cho, A. Endo, Q. Wan, M. K. Spassova, S. J. Keding, J. Allen, O. Ouerfelli, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2715-2725.
- [33] J. Zhu, Q. Wan, D. Lee, G. Yang, M. K. Spassova, O. Ouerfelli, G. Ragupathi, P. Damani, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 9298-9303.
- [34] R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 14462-14472.
- [35] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4421-4442.
- [36] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2007**, *46*, 5226-5230.
- [37] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2005**, *44*, 7624-7630.
- [38] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [39] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. B. Tandler, H. Kunz, *Bioorganic & medicinal chemistry* **1998**, *6*, 1531-1445.
- [40] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jimenez-Oses, M. Garcia de Luis, J. L. Asensio, J. Jimenez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 9458-9467.
- [41] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2011**, *50*, 9977-9981.
- [42] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *2011*, 3685-3689.
- [43] H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, Z. Y. Sun, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 1719-1723.
- [44] S. Ando, e. al., *The Journal of biological chemistry* **1989**, *264*, 3478-3483.
- [45] G. A. Nores, T. Dohi, M. Taniguchi, S. Hakomori, *The Journal of Immunology* **1987**, *139*, 3171-3176.
- [46] G. Ritter, E. Boosfeld, M. J. Calves, H. F. Oettgen, L. J. Old, P. O. Livingston, *Immunobiology* **1990**, *182*, 32-43.

- [47] G. Ragupathi, M. Meyers, S. Adluri, L. Howard, C. Musselli, P. O. Livingston, *International Journal of Cancer* **2000**, *85*, 659-666.
- [48] L. Toma, E. Di Cola, A. Ienco, L. Legnani, C. Lunghi, G. Moneti, B. Richichi, S. Ristori, D. Dell'Atti, C. Nativi, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2007**, *8*, 1646-1649.
- [49] A. Arcangeli, L. Toma, L. Contiero, O. Crociani, L. Legnani, C. Lunghi, E. Nesti, G. Moneti, B. Richichi, C. Nativi, *Bioconjug Chem* **2010**, *21*, 1432-1438.
- [50] R. Ribeiro-Viana, E. Bonechi, J. Rojo, C. Ballerini, G. Comito, B. Richichi, C. Nativi, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1317-1324.
- [51] B. Richichi, G. Comito, L. Cerofolini, G. Gabrielli, A. Marra, L. Moni, A. Pace, L. Pasquato, P. Chiarugi, A. Dondoni, L. Toma, C. Nativi, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2013**, *21*, 2756-2763.
- [52] J. Jimenez-Barbero, E. Dragoni, C. Venturi, F. Nannucci, A. Arda, M. Fontanella, S. Andre, F. J. Canada, H. J. Gabius, C. Nativi, *Chemistry* **2009**, *15*, 10423-10431.
- [53] R. Ravishankar, A. Surolia, M. Vijayan, S. Lim, Y. Kishi, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 11297-11303.
- [54] B. Kuberan, S. A. Sikkander, H. Tomiyama, R. J. Linhardt, *Angewandte Chemie* **2003**, *42*, 2073-2075.
- [55] D. R. Bundle, J. R. Rich, S. Jacques, H. N. Yu, M. Nitz, C. C. Ling, *Angewandte Chemie* **2005**, *44*, 7725-7729.
- [56] A. Hoffmann-Roder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2010**, *49*, 8498-8503.
- [57] E. Kaltgrad, S. Sen Gupta, S. Punna, C. Y. Huang, A. Chang, C. H. Wong, M. G. Finn, O. Blixt, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2007**, *8*, 1455-1462.
- [58] A. Miermont, H. Barnhill, E. Strable, X. Lu, K. A. Wall, Q. Wang, M. G. Finn, X. Huang, *Chemistry* **2008**, *14*, 4939-4947.
- [59] Z. Yin, H. G. Nguyen, S. Chowdhury, P. Bentley, M. A. Bruckman, A. Miermont, J. C. Gildersleeve, Q. Wang, X. Huang, *Bioconjug Chem* **2012**, *23*, 1694-1703.
- [60] Z. Yin, M. Comellas-Aragones, S. Chowdhury, P. Bentley, K. Kaczanowska, L. Benmohamed, J. C. Gildersleeve, M. G. Finn, X. Huang, *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 1253-1262.
- [61] T. Buskas, S. Ingale, G. J. Boons, *Angewandte Chemie* **2005**, *44*, 5985-5988.
- [62] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 663-667.
- [63] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G. J. Boons, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2009**, *10*, 455-463.
- [64] S. Sarkar, S. A. Lombardo, D. N. Herner, R. S. Talan, K. A. Wall, S. J. Sucheck, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 17236-17246.
- [65] W. Chen, L. Gu, W. Zhang, E. Motari, L. Cai, T. J. Styslinger, P. G. Wang, *ACS chemical biology* **2011**, *6*, 185-191.
- [66] S. Sarkar, A. C. Salyer, K. A. Wall, S. J. Sucheck, *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 363-375.
- [67] B. A. Cobb, D. L. Kasper, *Cell Microbiol* **2005**, *7*, 1398-1403.
- [68] A. Tzianabos, J. Y. Wang, D. L. Kasper, *Carbohydrate research* **2003**, *338*, 2531-2538.
- [69] R. A. De Silva, Q. Wang, T. Chidley, D. K. Appulage, P. R. Andreana, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 9622-9623.
- [70] R. A. De Silva, D. K. Appulage, H. Pietraszkiewicz, K. R. Bobbitt, J. Media, J. Shaw, F. A. Valeriote, P. R. Andreana, *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2012**, *61*, 581-585.
- [71] J. P. Bourgault, K. R. Trabbic, M. Shi, P. R. Andreana, *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, *12*, 1699-1702.
- [72] C. Geraci, G. M. Consoli, E. Galante, E. Bousquet, M. Pappalardo, A. Spadaro, *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 751-758.

- [73] J. P. Tam, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 5409-5413.
- [74] S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzene, *The Journal of Peptide Research* **2009**, *49*, 620-625.
- [75] R. Lo-Man, S. Bay, S. Vichier-Guerre, E. Deriaud, D. Cantacuzene, C. Leclerc, *Cancer research* **1999**, *59*, 1520-1524.
- [76] R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, S. Bay, E. Deriaud, D. Cantacuzene, C. Leclerc, *The Journal of Immunology* **2001**, *166*, 2849-2854.
- [77] R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, R. Perraut, E. Deriaud, V. Huteau, L. BenMohamed, O. M. Diop, P. O. Livingston, S. Bay, C. Leclerc, *Cancer research* **2004**, *64*, 4987-4994.
- [78] J. Alexander, J. Sidney, S. Southwood, J. Ruppert, C. Oseroff, A. Maewal, K. Snoke, H. M. Serra, R. T. Kubo, A. Sette, H. M. Grey, *Immunity* **1994**, *1*, 751-761.
- [79] T. Freire, X. Zhang, E. Deriaud, C. Ganneau, S. Vichier-Guerre, E. Azria, O. Launay, R. Lo-Man, S. Bay, C. Leclerc, *Blood* **2010**, *116*, 3526-3536.
- [80] M. Glaffig, B. Palitzsch, S. Hartmann, C. Schull, L. Nuhn, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Chemistry* **2014**, *20*, 4232-4236.
- [81] H. Cai, M. S. Chen, Z. Y. Sun, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angewandte Chemie* **2013**, *52*, 6106-6110.
- [82] G. A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. F. Delmas, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968.
- [83] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 6396-6406.
- [84] H. Cai, Z. Y. Sun, M. S. Chen, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angewandte Chemie* **2014**, *53*, 1699-1703.
- [85] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 366-369.
- [86] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2005**, *44*, 7630-7635.
- [87] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [88] T. Toyokuni, e. al., *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 395-396.
- [89] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y. M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2010**, *49*, 3688-3692.
- [90] B. L. Wilkinson, L. R. Malins, C. K. Chun, R. J. Payne, *Chemical communications* **2010**, *46*, 6249-6251.
- [91] P. W. Glunz, S. Hintermann, J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X.-T. Chen, L. J. Williams, D. Sames, S. J. Danishefsky, V. Kudryashov, K. O. Lloyd, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 10636-10637.
- [92] P. W. Glunz, S. Hintermann, L. J. Williams, J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, V. Kudryashov, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 7273-7279.
- [93] V. Kudryashov, P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, K. O. Lloyd, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 3264-3269.
- [94] S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 11937-11942.
- [95] H. Cai, Z. Y. Sun, Z. H. Huang, L. Shi, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Chemistry* **2013**, *19*, 1962-1970.
- [96] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angewandte Chemie* **2011**, *50*, 1635-1639.
- [97] B. L. Wilkinson, S. Day, R. Chapman, S. Perrier, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Chemistry* **2012**, *18*, 16540-16548.

- [98] P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1255-1258.
- [99] M. Mutter, S. p. Vuilleumier, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, *28*, 535-554.
- [100] M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 1482-1485.
- [101] M. C. Galan, P. Dumy, O. Renaudet, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4599-4612.
- [102] S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Deriaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1149-1159.
- [103] O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737-741.
- [104] I. Bettahi, G. Dasgupta, O. Renaudet, A. A. Chentoufi, X. Zhang, D. Carpenter, S. Yoon, P. Dumy, L. BenMohamed, *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2009**, *58*, 187-200.
- [105] O. Renaudet, G. Dasgupta, I. Bettahi, A. Shi, A. B. Nesburn, P. Dumy, L. BenMohamed, *PLoS one* **2010**, *5*, e11216.
- [106] D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem Rev* **2009**, *109*, 131-163.
- [107] B. G. Davis, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 579-602.
- [108] K. A. Winans, D. S. King, V. R. Rao, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11700-11710.
- [109] B. Liebe, H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 618-621.
- [110] A. Kuhn, H. Kunz, *Angewandte Chemie* **2007**, *46*, 454-458.
- [111] N. Bézay, G. Dudziak, A. Liese, H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2292-2295.
- [112] J. D. Codee, R. E. Litjens, R. den Heeten, H. S. Overkleeft, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, *Org Lett* **2003**, *5*, 1519-1522.
- [113] D. Cato, T. Buskas, G. J. Boons, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2005**, *24*, 503-516.
- [114] S. J. Keding, A. Endo, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7023-7031.
- [115] S. A. Svarovsky, J. J. Barchi, *Carbohydrate research* **2003**, *338*, 1925-1935.
- [116] K. Rose, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 30-33.
- [117] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [118] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [119] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [120] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, *Angewandte Chemie* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [121] J. F. Lutz, *Angewandte Chemie* **2008**, *47*, 2182-2184.
- [122] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. van Hest, *Angewandte Chemie* **2011**, *50*, 8806-8827.
- [123] M. Kohn, R. Breinbauer, *Angewandte Chemie* **2004**, *43*, 3106-3116.
- [124] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [125] C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Brase, *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 4840-4871.
- [126] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E. J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 9116-9121.
- [127] H. Zhang, Y. Ma, X. L. Sun, *Chemical communications* **2009**, 3032-3034.
- [128] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Organic Letters* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [129] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Organic Letters* **2000**, *2*, 1939-1941.
- [130] C. Grandjean, A. Boutonnier, C. Guerreiro, J. M. Fournier, L. A. Mulard, *The Journal of organic chemistry* **2005**, *70*, 7123-7132.
- [131] G. Hosein Hakimelahi, G. Just, *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 2119-2122.

- [132] R. V. Kolakowski, N. Shangguan, R. R. Sauers, L. J. Williams, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 5695-5702.
- [133] R. V. Kolakowski, N. Shangguan, L. J. Williams, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 1163-1166.
- [134] N. Shangguan, S. Katukojvala, R. Greenberg, L. J. Williams, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 7754-7755.
- [135] F. Fazio, C.-H. Wong, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 9083-9085.
- [136] H. R. Kricheldorf, E. Leppert, *Makromol. Chem.* **1973**, *167*, 47-68.
- [137] D. Crich, K. Sasaki, *Org Lett* **2009**, *11*, 3514-3517.
- [138] T. Fukuyama, M. Cheung, C.-K. Jow, Y. Hidai, T. Kan, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 5831-5834.
- [139] D. Crich, K. Sana, S. Guo, *Org Lett* **2007**, *9*, 4423-4426.
- [140] R. S. Talan, A. K. Sanki, S. J. Sucheck, *Carbohydrate research* **2009**, *344*, 2048-2050.
- [141] T. Messeri, D. D. Sternbach, N. C. O. Tomkinson, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 1669-1672.
- [142] X. Li, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5446-5448.
- [143] X. Li, Y. Yuan, C. Kan, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13225-13227.
- [144] Y. Rao, X. Li, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 12924-12926.
- [145] P. Wang, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 17045-17051.
- [146] V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **2011**, *480*, 471-479.
- [147] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angewandte Chemie* **2006**, *45*, 1248-1252.
- [148] I. Pusterla, J. W. Bode, *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 513-516.
- [149] L. Ju, A. R. Lippert, J. W. Bode, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 4253-4255.
- [150] L. Ju, J. W. Bode, *Organic & biomolecular chemistry* **2009**, *7*, 2259-2264.
- [151] J. Wu, J. Ruiz-Rodriguez, J. M. Comstock, J. Z. Dong, J. W. Bode, *Chemical Science* **2011**, *2*, 1976.
- [152] C. Pöhner, V. Ullmann, R. Hilpert, E. Samain, C. Unverzagt, *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 2197-2200.
- [153] A. K. Sanki, R. S. Talan, S. J. Sucheck, *The Journal of organic chemistry* **2009**, *74*, 1886-1896.
- [154] A. M. Dumas, G. A. Molander, J. W. Bode, *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 5683-5686.
- [155] C. F. Liu, J. P. Tam, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 6584-6588.
- [156] H. C. Xu, K. D. Moeller, *Org Lett* **2010**, *12*, 1720-1723.
- [157] H. Liu, X. Li, *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, *12*, 3768-3773.
- [158] X. Li, H. Y. Lam, Y. Zhang, C. K. Chan, *Org Lett* **2010**, *12*, 1724-1727.
- [159] Y. Zhang, C. Xu, H. Y. Lam, C. L. Lee, X. Li, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 6657-6662.
- [160] C. Xu, H. Y. Lam, Y. Zhang, X. Li, *Chemical communications* **2013**, *49*, 6200-6202.
- [161] D. S. Kemp, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1793-1804.
- [162] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [163] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angewandte Chemie* **2007**, *46*, 9248-9252.
- [164] J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2277-2283.
- [165] R. G. Kallen, *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 6236-6248.
- [166] M. P. Schubert, *Journal of Biological Chemistry* **1935**, *111*, 671-678.
- [167] C. Rao, J. P. Tam, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 6975-6976.
- [168] H. Mirzaei, F. Regnier, *J Chromatogr A* **2006**, *1134*, 122-133.
- [169] O. El-Mahdi, O. Melnyk, *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 735-765.
- [170] T. P. King, S. W. Zhao, T. Lam, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5774-5779.

- [171] S. Peluso, B. Imperiali, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 2085-2087.
- [172] E. C. Rodriguez, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *The Journal of organic chemistry* **1998**, *63*, 7134-7135.
- [173] H. Bader, L. C. Cross, I. Heilbron, E. R. H. Jones, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1949**, 619.
- [174] A. Dondoni, A. Marra, *Chemical Society reviews* **2012**, *41*, 573-586.
- [175] M. Lo Conte, S. Pacifico, A. Chambery, A. Marra, A. Dondoni, *The Journal of organic chemistry* **2010**, *75*, 4644-4647.
- [176] J. Ni, S. Singh, L. X. Wang, *Bioconjug Chem* **2003**, *14*, 232-238.
- [177] I. Shin, H.-j. Jung, M.-r. Lee, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 1325-1328.
- [178] S. B. Cohen, R. L. Halcomb, *Organic Letters* **2001**, *3*, 405-407.
- [179] S. B. Cohen, R. L. Halcomb, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 2534-2543.
- [180] G. L. Ellman, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, *82*, 70-77.
- [181] B. G. Davis, R. C. Lloyd, J. B. Jones, *The Journal of organic chemistry* **1998**, *63*, 9614-9615.
- [182] D. L. Boger, *Chemical Reviews* **1986**, *86*, 781-793.
- [183] D. C. Rideout, R. Breslow, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 7816-7817.
- [184] T. Machiguchi, T. Hasegawa, A. Ishiwata, S. Terashima, S. Yamabe, T. Minato, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 4771-4786.
- [185] V. Pozsgay, N. E. Vieira, A. Yergey, *Organic Letters* **2002**, *4*, 3191-3194.
- [186] Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, G. J. Bernardes, B. G. Davis, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 9642-9643.
- [187] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34*, 727-736.
- [188] R. J. Payne, C. H. Wong, *Chemical communications* **2010**, *46*, 21-43.
- [189] T. K. Tiefenbrunn, P. E. Dawson, *Biopolymers* **2010**, *94*, 95-106.
- [190] J. Langenhan, J. Thorson, *Current Organic Synthesis* **2005**, *2*, 59-81.
- [191] W. Tang, M. L. Becker, *Chemical Society reviews* **2014**, *43*, 7013-7039.
- [192] A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94-95.
- [193] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Mobius, *Chemische Berichte-Recueil* **1967**, *100*, 2494-2507.
- [194] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of organic chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [195] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [196] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [197] S. G. Gouin, L. Bultel, C. Falentin, J. Kovensky, *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, *2007*, 1160-1167.
- [198] S. G. Gouin, J. M. Garcia Fernandez, E. Vanquelef, F. Y. Dupradeau, E. Salomonsson, H. Leffler, M. Ortega-Munoz, U. J. Nilsson, J. Kovensky, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2010**, *11*, 1430-1442.
- [199] S. Bernardi, P. Fezzardi, G. Rispoli, S. E. Sestito, F. Peri, F. Sansone, A. Casnati, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1672-1680.
- [200] J. Bouckaert, Z. Li, C. Xavier, M. Almant, V. Caveliers, T. Lahoutte, S. D. Weeks, J. Kovensky, S. G. Gouin, *Chemistry* **2013**, *19*, 7847-7855.
- [201] M. L. Gening, D. V. Titov, S. Cecioni, A. Audfray, A. G. Gerbst, Y. E. Tsvetkov, V. B. Krylov, A. Imberty, N. E. Nifantiev, S. Vidal, *Chemistry* **2013**, *19*, 9272-9285.
- [202] S. G. Gouin, E. Vanquelef, J. M. Fernandez, C. O. Mellet, F. Y. Dupradeau, J. Kovensky, *The Journal of organic chemistry* **2007**, *72*, 9032-9045.
- [203] B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, E. Souteyrand, J. J. Vasseur, Y. Chevlot, F. Morvan, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 7620-7626.

- [204] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 210-216.
- [205] H. A. Orgueira, D. Fokas, Y. Isome, P. C. M. Chan, C. M. Baldino, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2911-2914.
- [206] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, *446*, 1105-1109.
- [207] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, D. P. Gamblin, B. G. Davis, *Nat Protoc* **2007**, *2*, 3185-3194.
- [208] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, 9879-9883.
- [209] D. J. Lee, S. H. Yang, G. M. Williams, M. A. Brimble, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 7564-7571.
- [210] D. J. Lee, P. W. Harris, M. A. Brimble, *Organic & biomolecular chemistry* **2011**, *9*, 1621-1626.
- [211] M. R. Levengood, C. C. Kerwood, C. Chatterjee, W. A. van der Donk, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2009**, *10*, 911-919.
- [212] P. Y. Liu, N. Jiang, J. Zhang, X. Wei, H. H. Lin, X. Q. Yu, *Chem Biodivers* **2006**, *3*, 958-966.
- [213] C. Bure, P. Marceau, H. Meudal, A. F. Delmas, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2012**, *18*, 147-154.
- [214] S. Ulrich, D. Boturnyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chemistry* **2014**, *20*, 34-41.
- [215] K. D. Roberts, J. N. Lambert, N. J. Ede, A. M. Bray, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2004**, *10*, 659-665.
- [216] Y. Sohma, S. B. Kent, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 16313-16318.
- [217] Y. Singh, P. Murat, E. Defrancq, *Chemical Society reviews* **2010**, *39*, 2054-2070.
- [218] L. L. Kiessling, R. A. Splain, *Annual review of biochemistry* **2010**, *79*, 619-653.
- [219] L. A. Marcaurette, Y. Shin, S. Goon, C. R. Bertozzi, *Organic Letters* **2001**, *3*, 3691-3694.
- [220] J. Shao, J. P. Tam, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3893-3899.
- [221] K. Rose, W. Zeng, P. O. Regamey, I. V. Chernushevich, K. G. Standing, H. F. Gaertner, *Bioconjug Chem* **1996**, *7*, 552-556.
- [222] S. Salahuddin, O. Renaudet, J. L. Reymond, *Organic & biomolecular chemistry* **2004**, *2*, 1471-1475.
- [223] aD. Macmillan, R. Bill, K. Sage, D. Fern, S. Flitsch, *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 133-145; bN. J. Davis, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 6793-6796.
- [224] M. Bengtsson, J. Broddefalk, J. Dahmen, K. Henriksson, J. Kihlberg, H. Lonn, B. R. Srinivasa, K. Stenvall, *Glycoconjugate Journal* **1998**, *15*, 223-231.
- [225] C. Grandjean, V. Santraine, J.-S. Fruchart, O. Melnyk, H. Gras-Masse, *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 887-892.
- [226] C. Grandjean, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Chemistry* **2001**, *7*, 230-239.
- [227] T. Posner, *Chem. Ber.* **1905**, *38*, 646-657.
- [228] M. S. Kharasch, A. T. Read, F. R. Mayo, *Chemical Industry* **1938**, *57*, 752-754.
- [229] A. B. Lowe, *Polymer Chemistry* **2010**, *1*, 17.
- [230] M. Fiore, A. Chambery, A. Marra, A. Dondoni, *Organic & biomolecular chemistry* **2009**, *7*, 3910-3913.
- [231] D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *The Journal of organic chemistry* **2001**, *66*, 8309-8319.
- [232] R. Sharma, K. Naresh, Y. M. Chabre, R. Rej, N. K. Saadeh, R. Roy, *Polymer Chemistry* **2014**, *5*, 4321.
- [233] M. Ghirardello, K. Öberg, S. Staderini, O. Renaudet, N. Berthet, P. Dumy, Y. Hed, A. Marra, M. Malkoch, A. Dondoni, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2014**, *52*, 2422-2433.
- [234] M. Fiore, N. Berthet, O. Renaudet, V. Barbier, *MedChemComm* **2014**, *5*, 1202.
- [235] M. Lo Conte, S. Staderini, A. Chambery, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Marra, A. Dondoni, *Organic & biomolecular chemistry* **2012**, *10*, 3269-3277.

- [236] A. Marra, S. Staderini, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Dondoni, *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, 2013, 1144-1149.
- [237] M. T. Bilodeau, T. K. Park, S. Hu, J. T. Randolph, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, S. Zhang, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 7840-7841.
- [238] S. Andre, O. Renaudet, I. Bossu, P. Dumy, H. J. Gabius, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2011**, 17, 427-437.
- [239] B. Helferich, J. Werner, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1943**, 76, 592-594.
- [240] aB. Roy, B. Mukhopadhyay, *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 3783-3787; bB. Mukhopadhyay, *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 4337-4341.
- [241] K. K. Yeoh, T. D. Butters, B. L. Wilkinson, A. J. Fairbanks, *Carbohydrate research* **2009**, 344, 586-591.
- [242] E. Fernandez-Megia, J. Correa, I. Rodríguez-Meizoso, R. Riguera, *Macromolecules* **2006**, 39, 2113-2120.
- [243] H. B. Mereyala, S. R. Gurralla, *Carbohydrate research* **1998**, 307, 351-354.
- [244] N. Miller, G. M. Williams, M. A. Brimble, *Org Lett* **2009**, 11, 2409-2412.
- [245] N. Miller, G. M. Williams, M. A. Brimble, *Organic Letters* **2010**, 12, 1375-1376.
- [246] L. Nagel, C. Budke, R. S. Erdmann, A. Dreyer, H. Wennemers, T. Koop, N. Sewald, *Chemistry* **2012**, 18, 12783-12793.
- [247] Y. Tachibana, N. Matsubara, F. Nakajima, T. Tsuda, S. Tsuda, K. Monde, S.-I. Nishimura, *Tetrahedron* **2002**, 58, 10213-10224.
- [248] W. Lin, X. Zhang, Z. He, Y. Jin, L. Gong, A. Mi, *Synthetic Communications* **2002**, 32, 3279-3284.
- [249] T. Rosen, I. M. Lico, D. T. W. Chu, *The Journal of organic chemistry* **1988**, 53, 1580-1582.
- [250] L. Kovács, E. Ósz, V. Domokos, W. Holzer, Z. Györgydeák, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4609-4621.
- [251] P. Boullanger, V. Maunier, D. Lafont, *Carbohydrate research* **2000**, 324, 97-106.
- [252] G. Zemlén, E. Pacsu, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1929**, 62, 1613-1614.
- [253] A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz, P. Delangle, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 286-296.
- [254] I. Bossu, M. Sulc, K. Krenek, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, P. Dumy, V. Kren, O. Renaudet, *Organic & biomolecular chemistry* **2011**, 9, 1948-1959.
- [255] O. Renaudet, P. Dumy, *Org Lett* **2003**, 5, 243-246.
- [256] A. Le Chevalier Isaad, F. Barbetti, P. Rovero, A. M. D'Ursi, M. Chelli, M. Chorev, A. M. Papini, *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2008, 5308-5314.
- [257] P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 6029-6032.
- [258] P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 10773-10778.
- [259] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org Lett* **2007**, 9, 3797-3800.
- [260] N. A. Uhlich, T. Darbre, J. L. Reymond, *Organic & biomolecular chemistry* **2011**, 9, 7071-7084.
- [261] B. Richichi, B. Thomas, M. Fiore, R. Bosco, H. Qureshi, C. Nativi, O. Renaudet, L. BenMohamed, *Angewandte Chemie* **2014**, 53, 11917-11920.
- [262] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 321-327.
- [263] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chemical Reviews* **2002**, 102, 555-578.
- [264] R. J. Pieters, *Organic & biomolecular chemistry* **2009**, 7, 2013-2025.
- [265] N. Jayaraman, *Chemical Society reviews* **2009**, 38, 3463-3483.
- [266] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angewandte Chemie* **2006**, 45, 2348-2368.
- [267] D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Organic & biomolecular chemistry* **2011**, 9, 966-979.
- [268] T. K. Dam, T. A. Gerken, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2009**, 48, 3822-3827.

- [269] I. Gitsov, K. L. Wooley, C. J. Hawker, P. T. Ivanova, J. M. J. Frechet, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5621-5627.
- [270] A. Imberty, M. Wimmerová, E. P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, *Microbes and Infection* **2004**, *6*, 221-228.
- [271] G. Cioci, E. P. Mitchell, C. Gautier, M. Wimmerová, D. Sudakevitz, S. Pérez, N. Gilboa-Garber, A. Imberty, *FEBS letters* **2003**, *555*, 297-301.
- [272] E. Mitchell, C. Houles, D. Sudakevitz, M. Wimmerova, C. Gautier, S. Perez, A. M. Wu, N. Gilboa-Garber, A. Imberty, *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 918-921.
- [273] A. Bernardi, J. Jimenez-Barbero, A. Casnati, C. De Castro, T. Darbre, F. Fieschi, J. Finne, H. Funken, K. E. Jaeger, M. Lahmann, T. K. Lindhorst, M. Marradi, P. Messner, A. Molinaro, P. V. Murphy, C. Nativi, S. Oscarson, S. Penades, F. Peri, R. J. Pieters, O. Renaudet, J. L. Reymond, B. Richichi, J. Rojo, F. Sansone, C. Schaffer, W. B. Turnbull, T. Velasco-Torrijos, S. Vidal, S. Vincent, T. Wennekes, H. Zuilhof, A. Imberty, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4709-4727.
- [274] I. Deguise, D. Lagnoux, R. Roy, *New Journal of Chemistry* **2007**, *31*, 1321.
- [275] J. L. Reymond, M. Bergmann, T. Darbre, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4814-4822.
- [276] N. Berthet, B. Thomas, I. Bossu, E. Dufour, E. Gillon, J. Garcia, N. Spinelli, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet, *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 1598-1611.
- [277] N. Nazarpak-Kandlousy, I. V. Chernushevich, L. Meng, Y. Yang, A. V. Eliseev, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 3358-3366.
- [278] B. Thomas, N. Berthet, J. Garcia, P. Dumy, O. Renaudet, *Chemical communications* **2013**, *49*, 10796-10798.
- [279] R. Roy, *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1*, 327-336.
- [280] V. Ladmiral, G. Mantovani, G. J. Clarkson, S. Cauet, J. L. Irwin, D. M. Haddleton, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 4823-4830.
- [281] C. R. Becer, M. I. Gibson, J. Geng, R. Ilyas, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddleton, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 15130-15132.
- [282] O. Ramström, J.-M. Lehn, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2000**, *1*, 41-48.
- [283] O. Ramstrom, S. Lohmann, T. Bunyapaiboonsri, J. M. Lehn, *Chemistry* **2004**, *10*, 1711-1715.
- [284] A. Patel, Thisbe K. Lindhorst, *European Journal of Organic Chemistry* **2002**, *2002*, 79-86.
- [285] K. Elsner, M. M. Boysen, T. K. Lindhorst, *Carbohydrate research* **2007**, *342*, 1715-1725.
- [286] T. K. Lindhorst, K. Bruegge, A. Fuchs, O. Sperling, *Beilstein journal of organic chemistry* **2010**, *6*, 801-809.
- [287] S. J. Hou, R. Saksena, P. Kovac, *Carbohydrate research* **2008**, *343*, 196-210.
- [288] J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lönnberg, *The Journal of organic chemistry* **2002**, *67*, 7995-8001.
- [289] G. Pourceau, A. Meyer, J. J. Vasseur, F. Morvan, *The Journal of organic chemistry* **2009**, *74*, 1218-1222.
- [290] M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J. X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutierrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. Garcia Fernandez, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7970-7971.
- [291] J. L. Jimenez Blanco, C. Ortiz Mellet, J. M. Garcia Fernandez, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4518-4531.
- [292] M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, R. Gutierrez-Gallego, A. Maestre, C. O. Mellet, J. M. Fernandez, J. L. Blanco, *Organic & biomolecular chemistry* **2010**, *8*, 1849-1860.
- [293] M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, A. P. Butera, C. Ortiz Mellet, J. M. Garcia Fernandez, J. L. Jimenez Blanco, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 1273-1288.
- [294] V. Dulery, O. Renaudet, M. Wilczewski, A. Van der Heyden, P. Labbe, P. Dumy, *J Comb Chem* **2008**, *10*, 368-371.

- [295] M. Fiore, B. Thomas, V. Duléry, P. Dumy, O. Renaudet, *New Journal of Chemistry* **2013**, *37*, 286.
- [296] B. Thomas, M. Fiore, I. Bossu, P. Dumy, O. Renaudet, *Beilstein journal of organic chemistry* **2012**, *8*, 421-427.
- [297] M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy, D. Boturyn, *Angewandte Chemie* **2011**, *50*, 1901-1904.
- [298] M. Gingras, Y. M. Chabre, M. Roy, R. Roy, *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 4823-4841.
- [299] M. Fiore, N. Berthet, A. Marra, E. Gillon, P. Dumy, A. Dondoni, A. Imberty, O. Renaudet, *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11*, 7113-7122.
- [300] N. Kottari, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, R. Rej, R. Roy, *Chemical communications* **2014**, *50*, 1983-1985.
- [301] M. Fiore, G. C. Daskhan, B. Thomas, O. Renaudet, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1557-1563.
- [302] J. M. MacDougall, X. D. Zhang, W. E. Polgar, T. V. Khroyan, L. Toll, J. R. Cashman, *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*, 5809-5815.
- [303] B. Thomas, M. Fiore, G. C. Daskhan, N. Spinelli, O. Renaudet, *Chemical communications* **2014**.
- [304] B. Rohwedder, Y. Mutti, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 1175-1178.
- [305] O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chemistry* **2004**, *10*, 5988-5995.