



**HAL**  
open science

**NOUVELLE APPROCHE POUR  
L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE :  
SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE  
GLYCOPROTÉINES MODULAIRES BRANCHÉES  
ANALOGUES DE MUC1 OBTENUES PAR  
LIGATION CHIMIQUE.**

Gaëlle-Anne Cremer

► **To cite this version:**

Gaëlle-Anne Cremer. NOUVELLE APPROCHE POUR L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE: SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE GLYCOPROTÉINES MODULAIRES BRANCHÉES ANALOGUES DE MUC1 OBTENUES PAR LIGATION CHIMIQUE.. domain\_other. Université d'Orléans, 2005. Français. NNT: . tel-00011396

**HAL Id: tel-00011396**

**<https://theses.hal.science/tel-00011396>**

Submitted on 17 Jan 2006

**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.



THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

**Chimie biologique**

PAR

**Gaëlle-Anne CREMER**

**Nouvelle approche pour l'immunothérapie anti-tumorale : synthèse et évaluation de glycoprotéines modulaires branchées analogues de MUC1 obtenues par ligation chimique.**

*Soutenue de 15 Novembre 2005 devant le jury composé de :*

Oleg Melnyk, Chargé de recherche, CNRS, Institut de Biologie de Lille	Rapporteur
Jean-Paul Briand, Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg	Rapporteur
Friedrich Piller, Chargé de recherche, INSERM, Orléans	Examineur
Horst Kunz, Professeur, Institut de chimie organique, Mayence (DE)	Examineur
Patrick Rollin, Professeur, université d'Orléans	Examineur
Agnès Delmas, Directeur de recherche, CNRS, Orléans	Directeur de thèse

## **Remerciements**

*Ce mémoire est l'aboutissement de trois années de recherche effectuées au Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS-Orléans), dirigé par Monsieur Jean-Claude Beloeil. Ces travaux ont été financés par la région Centre et le CNRS avec la participation du Groupe Français des Peptides Protéines et de la ligue contre le cancer, comité de la région Centre.*

*Je remercie vivement Oleg Melnyk et Jean-Paul Briand d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Je remercie également Friedrich Piller, Horst Kunz et Patrick Rollin d'avoir examiné ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Agnès Delmas qui m'a encadrée et guidée tout au long de cette thèse. Merci pour sa confiance, ses précieux conseils, sa grande disponibilité et ses encouragements.*

*Je remercie vivement Véronique Piller, Friedrich Piller et Nicole Bureau pour leur collaboration sur les expériences d'immunisation.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Kunz pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi qu'à ses étudiants Sven Wittrock, Torsten Beker et Sebastian Dziadek pour m'avoir transmis une partie de leur savoir-faire. Ces trois mois passés en Allemagne furent une expérience enrichissante tant professionnelle que personnelle.*

*Un grand merci également à Corine Buré pour l'analyse des produits en spectrométrie de masse (parfois en dehors des dates de service, surtout à la fin... !)*

*Je voudrais également remercier les stagiaires que j'ai encadrés et qui ont contribué à ce travail, Aline Corteggiani, Cindy Montembault, Vincent Réau, Aurélie Guérin et Hanane Tariq.*

*Merci à l'équipe technique et administrative.*

*Je remercie très chaleureusement Dominique Lelièvre et Isidore Decostaire, leur humour, leur présence et leur soutien tout au long de ces trois années resteront de précieux souvenirs. Merci à Philippe Marceau, toujours disponible, qui nous a rejoint en cours de*

*route. Ces trois années passées dans cette merveilleuse équipe du « Gaipayd » où règne la joie et la bonne humeur resteront pour moi une belle aventure.*

*Je remercie toutes les personnes, du CBM et d'ailleurs, qui ont contribué à rendre ce travail de thèse agréable. Merci à la « pose café du 2<sup>ème</sup> », Merci à Céline, à Philippe.*

*Enfin, j'adresse un grand merci à toute ma famille. Merci à mes parents pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et m'avoir permis d'arriver jusque là. Merci à Laurent et Sylvain, d'être là, tout simplement. Merci à Eric pour qui les mots ne sauraient suffire...*

## *Abréviations*

### Solvants

AcOEt :	Acétate d'éthyle	HFIP :	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
PBS :	Phosphate Buffer Saline	MeOH :	Méthanol
CH <sub>3</sub> CN :	Acétonitrile	NMP :	<i>N</i> -Méthylpirrolidinone
CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> :	Nitrométhane	TFE :	2,2,2-Trifluoroéthanol
DCM :	Dichlorométhane	THF :	Tétrahydrofurane
DMF :	Diméthylformamide		
DMSO :	Diméthylsulfoxyde		

### Réactifs

ABTS :	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium
AcOH :	Acide acétique
Ac <sub>2</sub> O :	Anhydride acétique
Aoa :	Acide aminooxy acétique
DCC :	<i>N-N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DIEA :	Diisopropylethylamine
HATU :	2-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*
HBTU :	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate*
HOBt :	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole
NHS :	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
PyBop :	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
TIS :	Triisopropylsilane
TFA :	Acide trifluoroacétique

### Acides aminés, résine, bras espaceurs et peptides

A :	Alanine	R :	Arginine
D :	Acide aspartique	S :	Sérine
G :	Glycine	T :	Thréonine
H :	Histidine	V :	Valine
K :	Lysine	W :	Tryptophane
L :	Leucine	X :	Cyclohexylalanine
P :	Proline		

Muc : PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA

PADRE : Pan DR Epitope : aKXVAAWTLKAA

PEGA : Résine PolyéthylèneGlycolAcrylamide

PAM : bras espaceur Phénylacétamidométhyle

\* HBTU et HATU ont en fait été cristallisés sous forme de sels d'ammonium et devraient donc s'appeler respectivement *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(diméthylamine)méthyle]-*N*-méthylmethanamine hexafluorophosphate *N*-oxide et *N*-[(diméthylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-yl)méthyle]-*N*-méthylmethanamine hexafluorophosphate *N*-oxide. Albericio et al. *Lett. Pept. Sci.* **1994**, 1, 57.

### Dérivés saccharidiques

GalNAc : 2-acétamido-2-désoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyle  
GlcNAc : 2-acétamido-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyle  
GalGalNAc / Gal( $\beta_{1-3}$ )GalNAc :  
2-acétamido-2-désoxy-3-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyle)- $\alpha$ -D-galactopyranosyle

Pour des raisons de compréhension, les noms des dérivés saccharidiques plus complexes ont été simplifiés et ne correspondent pas à la nomenclature systématique.

### Groupes protecteurs

Ac :	Acétyle	Mtt :	Methyltrityl
Boc :	<i>tertio</i> -Butoxycarbonyle	Pbf :	2,2,4,6,7-Pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Bzn :	Benzylidène acétal	<i>t</i> Bu :	<i>tertio</i> -butyl
Dde :	4,4-Diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1- ylidène)3-méthylbutyl	Trt :	Trityl
Mmt :	Methoxytrityl		

### Analyses

HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
 $R_f$  : Rapport frontal  
*Tr* : Temps de rétention  
ESI : ElectroSpray Ionisation  
Maldi : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation  
FD : Field Desorption  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERALITES</b> .....	<b>4</b>
<b>I. MUC1</b> .....	<b>5</b>
I. 1 . Mucines : Structure et fonctions biologiques.....	5
I. 1 . A . La famille des mucines.....	5
I. 1 . B . Biosynthèse des chaînes <i>O</i> -glycanniques .....	5
I. 2 . MUC1 et les cancers épithéliaux .....	7
I. 3 . MUC1 et l'immunothérapie .....	9
I. 3 . A . Approche peptidique .....	9
I. 3 . B . Approche saccharidique.....	10
I. 3 . C . Approche mixte .....	14
I. 4 . Conclusion .....	17
<b>II . La ligation chimique</b> .....	<b>18</b>
II . 1 . Limites de la SPPS et définition de la ligation chimique .....	18
II . 2 . Les différentes méthodes de ligation .....	20
II . 2 . A . Oximes et hydrazones .....	20
II . 2 . B . Thioéther et thioester.....	22
II . 2 . C . Thiazolidine et pseudoproline .....	23
II . 2 . D . La ligation native <i>via</i> un peptide thioester .....	24
II . 2 . E . La ligation native <i>via</i> la réaction de Staudinger .....	26
II . 3 . La ligation en tandem .....	28
II . 4 . Utilisation de la ligation chimique pour la synthèse de dendrimères .....	32
II . 4 . A . Les TASP.....	32
II . 4 . B . Les MAP .....	34
II . 5 . Ligation oxime et hydrazone : Synthèse de peptides aldéhyde, aminoxy, hydrazide et hydrazine .....	36
II . 5 . A . Synthèse de peptides aldéhyde.....	36
II . 5 . B . Synthèse de peptides hydrazide et aminoxy .....	42
II . 6 . Conclusion .....	45
<b>III . Synthèse de glycopeptides</b> .....	<b>46</b>
III . 1 . Introduction .....	46
III . 2 . Les différentes méthodes de synthèse de glycopeptides .....	47
III . 3 . Synthèse de glycopeptides selon l'approche des synthons glycosylés .....	49
III . 3 . A . Synthèse de glycopeptides portant l'antigène Tn .....	49
III . 3 . B . Synthèse de glycopeptides portant des groupements saccharidiques complexes.....	52

III . 4 . Glycosylation enzymatique .....	57
III . 4 . A . Les différentes enzymes utilisées pour la glycosylation .....	57
III . 4 . B . Les glycosyltransférases de type Leloir .....	58
III . 4 . C . Exemples de glycosylation enzymatique .....	59
III . 5 . Synthèse de glycopeptides par ligation chimique .....	62
III . 5 . A . Fixation des saccharides par ligation chimique .....	62
III . 5 . B . Utilisation de la ligation native pour la synthèse de glycoprotéines .....	66
III . 6 . Conclusion.....	68

## **RESULTATS ET DISCUSSION ..... 69**

### **I . Rappels des objectifs..... 70**

### **II . Synthèse modulaire d'une petite protéine triantennée contenant des liaisons oxime 71**

II . 1 . Présentation de la chimère et schéma rétrosynthétique .....	71
II . 2 . Synthèse des synthons aminooxy .....	73
II . 2 . A . Aoa-Muc (3).....	73
II . 2 . B . Aoa-PADRE (2) .....	74
II . 3 . Synthèse du synthon Muc dialdéhyde masqué (4) .....	83
II . 3 . A . Présentation du synthon .....	83
II . 3 . B . Synthèse du peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5).....	85
II . 3 . C . Obtention du peptide dialdéhyde masqué Muc(Ser)Acétal (4) par aminolyse .....	90
II . 4 . Synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) .....	93
II . 4 . A . Présentation de la synthèse.....	93
II . 4 . B . Etude des différentes étapes de synthèse.....	95
II . 5 . Synthèse de nouvelles chimères pour l'étude de l'immunogénicité de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) .....	99
II . 5 . A . Conception des nouvelles chimères .....	99
II . 5 . B . Synthèse des nouvelles chimères .....	100
II . 6 . Etude de l'immunogénicité des chimères non glycosylées .....	102
II . 7 . Conclusion .....	105

### **III . Synthèse des chimère glycosylées ..... 106**

III . 1 . Stratégie de synthèse .....	106
III . 2 . Synthèse de peptide Aoa-Muc glycosylés.....	108
III . 2 . A . Principe de la synthèse.....	108
III . 2 . B . Synthèse des synthons Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac <sub>3</sub> GalNAc)-OH (20) et Fmoc-Thr(Ac <sub>4</sub> Gal( $\beta$ <sub>1</sub> $\rightarrow$ <sub>3</sub> )- $\alpha$ -Ac <sub>2</sub> GalNAc)-OH (21).....	109
III . 2 . C . Synthèse des glycopeptides acétylés (22) et (23).....	116
III . 2 . D . Glycopeptides déacétylés Aoa-MucTn (18) et Aoa-MucT(19) .....	117
III . 3 . Synthèse du synthon PADRE dialdéhyde masqué.....	118



III . 4 . Synthèse des chimères glycosylées .....	120
III . 4 . A . Synthèse des chimères glycosylées « symétriques » (41) et (42) .....	121
III . 4 . B . Synthèse de la chimère glycosylée « non symétrique » PADRE-Muc(MucTn)MucT (43).....	126
III . 5 . Etude de l'immunogénicité des chimères glycosylées .....	128
III . 6 . Conclusion.....	134
<b>IV . Perspectives concernant la géométrie des immunogènes non glycosylés.....</b>	<b>135</b>
IV . 1 . Conception des nouvelles chimères .....	135
IV . 2 . Synthèse des chimères .....	137
<b>V . Perspectives concernant la synthèse de nouvelles chimères incluant des liaisons hydrazide.....</b>	<b>139</b>
V . 1 . Synthèse du peptide hydrazide .....	139
V . 1 . A . Stratégie de synthèse.....	139
V . 1 . B . Mise au point des conditions d'hydrazinolyse .....	140
V . 2 . Mise au point des conditions de la formation de la liaison hydrazide avec différents partenaires aldéhyde et cétone.....	143
V . 2 . A . Description des synthons utilisés .....	143
V . 2 . B . Résultats des essais de ligation .....	145
V . 3 . Synthèse d'une chimère branchée avec des liaisons hydrazides .....	150
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>151</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>155</b>
<b>I . Méthodes générales.....</b>	<b>156</b>
<b>II . Synthèse des chimères non glycosylées.....</b>	<b>158</b>
<b>III . Synthèse des chimères glycosylées.....</b>	<b>166</b>
<b>IV . Synthèses relatives aux perspectives concernant la géométrie des immunogènes non glycosylés .....</b>	<b>186</b>
<b>V . Synthèses relatives aux perspectives concernant la synthèse de nouvelles chimères incluant des liaisons hydrazide.....</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>193</b>

# **Introduction**

Avec près de 150 000 décès par an en France, les cancers représentent, dans les pays développés, la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. Aujourd'hui, le traitement phare de nombreux cancers est la chirurgie, en association avec la radiothérapie et la chimiothérapie. Les traitements contre le cancer connaissent cependant une véritable révolution donnant naissance à des traitements plus efficaces et mieux tolérés par l'organisme.

L'immunothérapie est l'une de ces nouvelles approches mises en œuvre pour la lutte contre le cancer. L'immunothérapie passive consistant à administrer à des patients atteints de cancer des anticorps dirigés contre les cellules tumorales s'est montrée peu efficace. La radioimmunothérapie consistant à administrer des anticorps sur lesquels sont fixés des radionucléides pose également le problème de la spécificité des anticorps et de l'induction d'une réponse immunitaire contre ces anticorps. La recherche s'est donc tournée vers l'immunothérapie active dont le but est de stimuler le système immunitaire contre les antigènes tumoraux. La connaissance de ces antigènes spécifiques liés aux tumeurs a permis le développement de vaccins thérapeutiques composés non plus de cellules tumorales inactivées mais directement de ces antigènes.

La glycoprotéine MUC1 est un bon candidat pour une thérapie vaccinale anti-cancéreuse. En effet, elle est surexprimée à la surface des cellules cancéreuses et plusieurs antigènes tumoraux ont été identifiés, ces déterminants étant à la fois de type saccharidiques et peptidiques.

Depuis la découverte de l'immunogénicité de peptides synthétiques, de nombreuses recherches se sont portées sur la préparation de vaccins à base de peptides synthétiques. De tels vaccins présentent l'avantage par rapport aux formulations classiques d'être bon marché, facile à préparer et de présenter une très bonne innocuité pour l'organisme. Les peptides sont cependant de faibles immunogènes, d'où la nécessité de trouver des formulations plus performantes telles que le couplage à une protéine porteuse, la présentation sous forme de dendrimère, l'introduction d'une structure lipidique ou d'un épitope auxiliaire, l'adjonction d'un adjuvant...

Ces développements ont été appliqués au cas de MUC1 pour la préparation de constructions immunogènes à base des antigènes tumoraux peptidiques ou saccharidiques. Cependant, très peu d'exemples existent sur la construction d'immunogènes possédant ces deux types de déterminant alors que, d'après des résultats d'antigénicité, des constructions à base de glycopeptides ou glycoprotéines seraient de meilleurs candidats.

Le manque d'exemples de constructions immunogènes à base de glycopeptides ou glycoprotéines est sans doute dû au fait que la synthèse même de glycoprotéines n'en est en fait qu'à ses balbutiements et constitue l'un des défis majeurs de la chimie et de la biologie du 21<sup>ème</sup> siècle. Ceci s'explique par les difficultés considérables rencontrées dans un premier temps pour obtenir des glycoprotéines recombinantes, puis de séparer et ensuite purifier les différentes glycoformes obtenues. La seule approche générale et viable qui se dessine actuellement est leur synthèse par voie chimique. Les difficultés de synthèse sont principalement dues à la stabilité de la liaison glycosidique ainsi qu'à la multifonctionnalité de ses dérivés. Si quelques synthons commerciaux de type glycosylamino-acide sont commercialisés, ils sont toutefois d'un prix exorbitant et doivent donc être synthétisés au laboratoire, nécessitant une très bonne expérience de la glycochimie.

Utilisant les récents développements réalisés pour la synthèse de glycopeptides et glycoprotéines, l'objectif de cette thèse a été la mise au point de la synthèse de constructions glycoprotéiques capables d'induire une réponse immunitaire efficace et spécifique contre MUC1 tumorale.

Nous décrivons dans un premier temps l'intérêt de MUC1 comme modèle pour le développement d'une approche immunothérapeutique active à base de glycopeptides ainsi que les différentes approches ayant déjà été réalisées. Puis nous étudierons les outils chimiques nécessaires à la synthèse d'une telle construction. La ligation chimique semble en particulier être une méthode de choix pour la synthèse de construction protéiques ou glycoprotéiques.

Sera ensuite présenté le travail réalisé dans cette thèse qui est constitué de deux parties principales : la mise au point de chimères non glycosylées par ligation chimique puis l'application de cette stratégie de synthèse pour la synthèse de chimères glycosylées. Dans ces deux parties, l'immunogénicité des chimères synthétisées a pu être étudiée. Deux perspectives concernant la géométrie des chimères non glycosylées et le développement de nouvelles chimères contenant non plus des liaisons oxime mais des liaisons hydrazide ont également été développées.

# Généralités

# **I. MUC1**

## **I. 1. Mucines : Structure et fonctions biologiques**

### **I. 1. A. La famille des mucines**

Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire, principalement sécrétée et formant un gel visqueux, le mucus. Celui-ci recouvre la surface des cellules épithéliales et assure ainsi une fonction de protection vis-à-vis des agressions physiques, chimiques et biologiques subies par les cellules (microorganismes, enzymes protéolytiques, acides..). Les deux caractéristiques principales de cette famille de glycoprotéines sont :

-la présence d'un large domaine constitué principalement d'un nombre variable de séquences répétées les unes à la suite des autres (variable number of tandem repeat VNTR)<sup>1</sup>

-un haut degré de O-glycosylation (jusqu'à 90 % du poids moléculaire), en particulier sur le domaine VNTR.

La séquence répétée du domaine VNTR est propre à chaque mucine ; elle est cependant toujours riche en sérines et thréonines sur lesquelles sont greffées les chaînes glycosidiques. L'important degré de glycosylation ainsi que la présence de prolines confèrent aux mucines une structure rigide et étendue de 200 à 500 nm<sup>2</sup>.

### **I. 1. B. Biosynthèse des chaînes O-glycanniques**

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui a lieu dans l'appareil de Golgi. Dans le cas des mucines, la glycosylation sur les sérines et thréonines est initiée par la fixation d'une unité de galactosamine *N*-acétylée (GalNAc). Cette étape est réalisée par une famille de polypeptide-*N*-Acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNAc-T). Jusqu'à présent 15 ppGalNAc-T présentes chez les mammifères ont pu être clonées et exprimées sous leur forme active<sup>3</sup>. Ces enzymes, réparties différemment suivant les espèces, les organes ou l'étape de différenciation, ont des spécificités distinctes vis-à-vis des différents substrats peptidiques. Malgré de nombreuses recherches aucune séquence consensus n'a pu être identifiée pour déterminer les sites de glycosylation. Cependant, des études RMN ont tout de même pu montrer certaines relations entre la conformation du peptide et l'affinité de différentes ppGalNAc-T<sup>4</sup>. D'autre part la présence de sucres déjà présents sur le peptide influence

l'activité des ppGalNAc-T<sup>5</sup>. L'élongation de la chaîne glycanique se poursuit ensuite par l'action d'une série de glycosyltransférases spécifiques qui fixent successivement les glycosyles à la chaîne saccharidique en croissance.

Les différences d'expression des ppGalNAc-T ou autres glycosyltransférases, l'affinité spécifique de ces enzymes pour les substrats peptidiques, la disponibilité des substrats saccharidiques, ainsi que l'influence des groupements saccharidiques voisins, donnent lieu à une grande diversité dans la structure des chaînes glycaniques formées<sup>6</sup>. Les motifs de base de ces chaînes glycaniques sont représentés sur la figure 1.

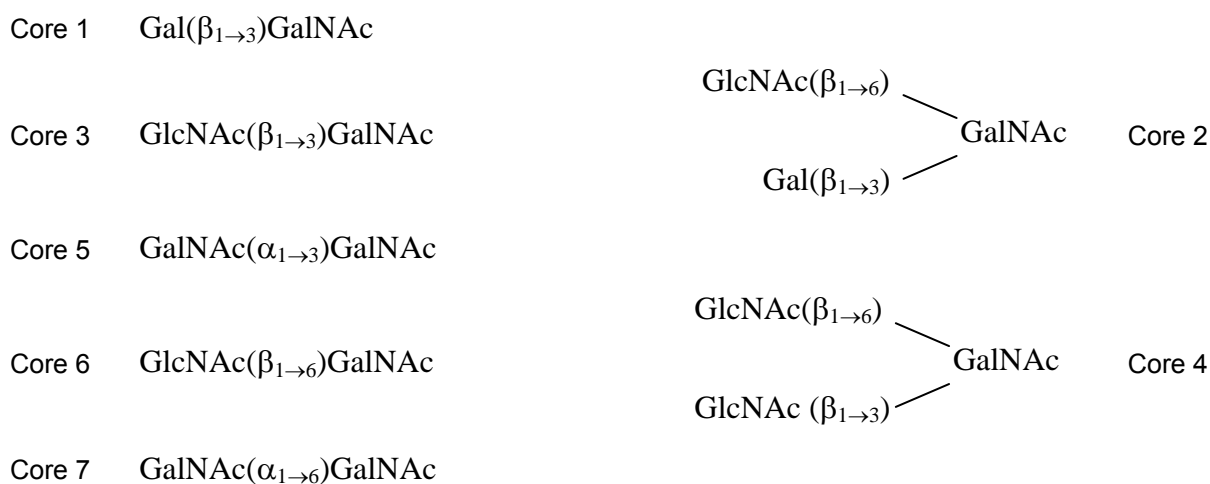


Figure 1 : Noyaux des chaînes O-glycanniques des mucines (Hanisch et Müller <sup>6</sup>)

La dernière étape de l'élongation est l'addition de l'acide sialique. Cependant, des mucines transmembranaires telles que Muc1 immatures non sialylées ou partiellement sialylées sont exposées à la surface de la cellule. Elles sont ensuite réinternalisées pour pouvoir être sialylées sur la totalité des sites. Les formes matures totalement sialylées sont générées après plusieurs réinternalisations successives<sup>7</sup>.

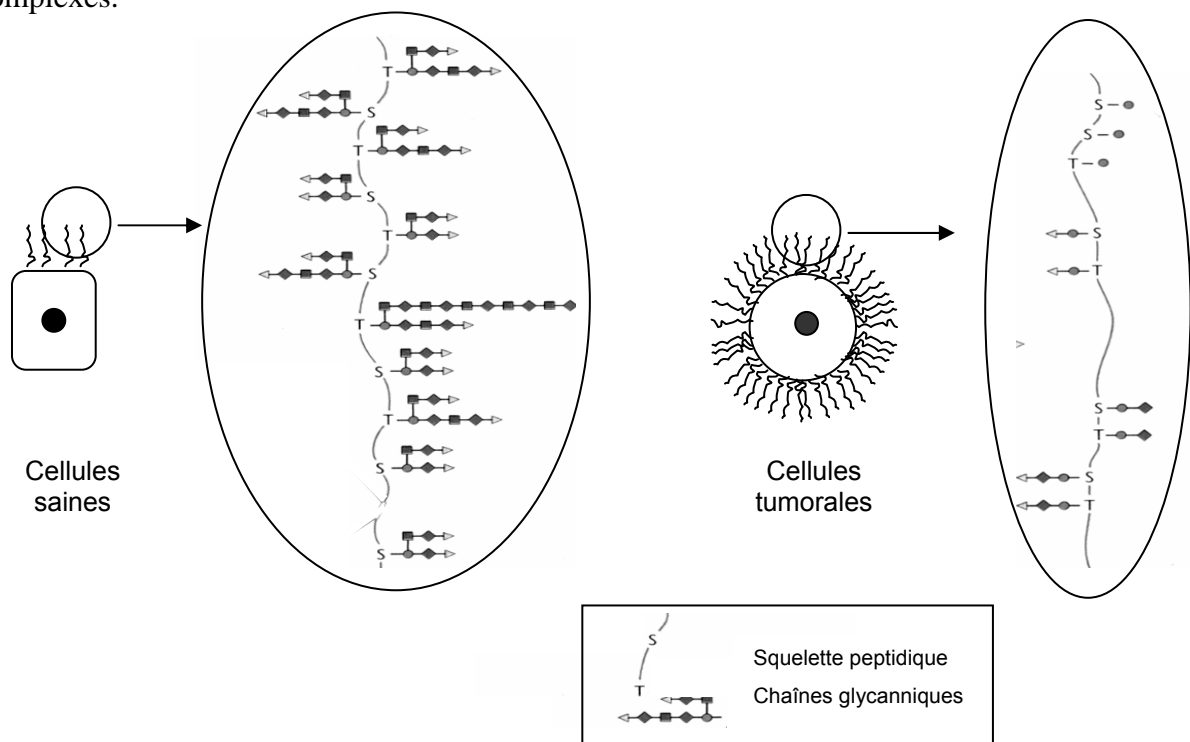
## I. 2 . MUC1 et les cancers épithéliaux

La mucine épithéliale polymorphe MUC1 (*polymorphic epithelial mucine* PEM), identifiée pour la première fois dans le lait maternel<sup>8</sup>, est la première mucine dont le gène a été séquencé<sup>9</sup>. Contrairement aux autres mucines, il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire, exprimée en position apicale des cellules épithéliales.

Le domaine extracellulaire contient le domaine VNTR dont la séquence, constituée de 20 acides aminés PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA (Muc1), peut être répétée de 25 à 125 fois. La séquence contient 5 sites potentiels de glycosylation (3 thréonines et 2 sérines).

Dans le cas des cellules épithéliales tumorales (cancer du sein, de l'ovaire, du colon, du pancréas) deux types de modifications ont été observés dans l'expression de MUC1 (Figure 2) :

- d'une part, elle est surexprimée à la surface des cellules et est présente, contrairement au cas des cellules saines, sur toute la surface de la cellule.
- d'autre part, les chaînes *O*-glycanniques sont beaucoup moins longues et moins complexes.



**Figure 2 :** Représentation schématique de l'expression de Muc1 dans les cellules épithéliales saines et les cellules épithéliales tumorales



Les changements dans l'état de glycosylation seraient dus à une variation de l'expression des glycosyltransférases<sup>10</sup>. Certaines sont moins exprimées ou moins actives, d'autres ont une activité plus importante, en particulier les Sialyltransférases qui stoppent l'élongation de la chaîne. Ceci aboutit à la présence de nouveaux antigènes saccharidiques, moins complexes, souvent sialylés (épitopes T, Tn, Sialyl-T, Sialyl Tn)<sup>11</sup> (Figure 3). Ces antigènes saccharidiques étant spécifiques des cellules tumorales, ce sont des antigènes tumoraux spécifiques.

Du fait de la sous-glycosylation, le squelette peptidique devient beaucoup plus accessible que dans le cas des cellules saines laissant apparaître de nouveaux épitopes peptidiques qui sont également des antigènes tumoraux spécifiques.

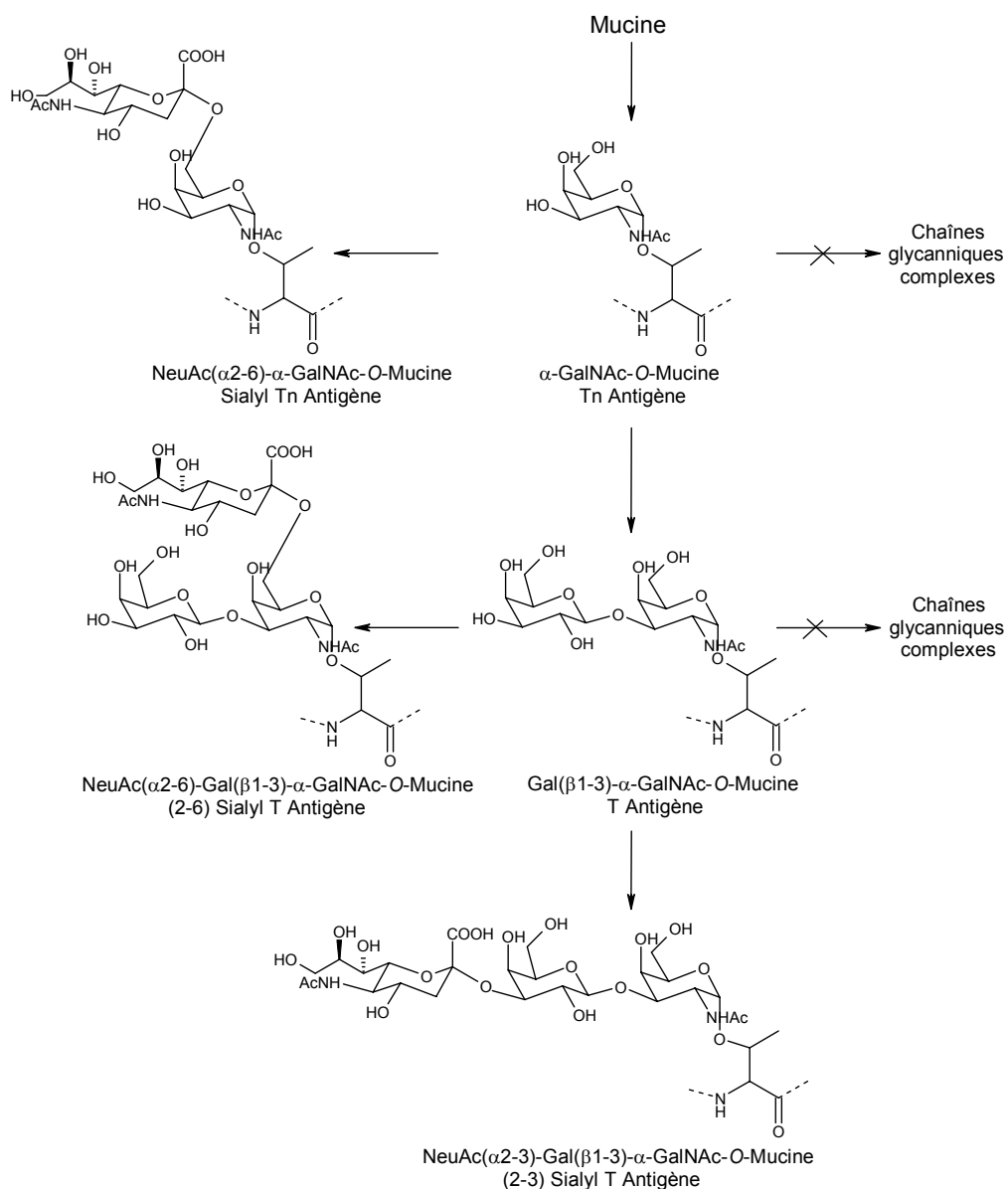


Figure 3 : Chaînes O-glycanniques des mucines dans les cellules tumorales (d'après Hanisch *et al*<sup>11</sup>)

### **I. 3 . MUC1 et l'immunothérapie**

Du fait de la présence des antigènes spécifiques de la forme tumorale de MUC1, une attention grandissante a été donnée à celle-ci comme cible potentielle pour l'immunothérapie antitumorale<sup>12</sup>. Le principe de celle-ci est de présenter au système immunitaire les antigènes tumoraux afin de stimuler une réponse immunitaire contre MUC1 tumorale amplifiée par rapport à celle qui peut exister de façon naturelle. Cette stratégie a déjà fait l'objet de plusieurs développements, certains essais cliniques ayant même été réalisés<sup>12d</sup>.

Deux options peuvent être envisagées. La première est d'induire une réponse cellulaire, il s'agit donc de stimuler la prolifération de lymphocytes T-cytotoxiques. La deuxième option à laquelle nous nous sommes intéressés dans cette thèse est d'induire une réponse humorale, c'est-à-dire la production d'anticorps anti-MUC1 tumorale. En effet, une réponse humorale anti-MUC1 naturelle a été mise en évidence chez certaines patientes atteintes d'un cancer du sein et la présence d'anticorps anti-MUC1 a été corrélée avec un meilleur pronostic<sup>13</sup>. Cependant cette réponse reste de faible intensité. Les différentes approches qui ont été testées afin d'augmenter l'intensité de cette réponse peuvent être classées en trois catégories suivant la présentation soit d'épitopes peptidiques, soit d'épitopes saccharidiques, soit d'épitopes peptidiques et saccharidiques.

#### **I. 3 . A . Approche peptidique**

L'approche peptidique est la première à avoir été abordée. Une étude clinique de phase 1 réalisée sur des patients atteints d'adénocarcinome a montré qu'il était possible d'induire une réponse immunitaire cytotoxique contre MUC1 en administrant aux patients un peptide de 105 acides-aminés avec le BCG comme adjuvant (Bacillus Calmette-Guérin)<sup>14</sup>.

Parallèlement, il a été montré qu'un peptide de 20 ou 30 acides aminés couplé à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine, une protéine hautement immunogène) par l'intermédiaire du MBS (m-maléimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide) administré avec QS-21 comme adjuvant est suffisant pour induire chez la souris une forte production d'anticorps anti-MUC1. Les anticorps ainsi produits réagissent avec les cellules tumorales exprimant MUC1 et, bien qu'aucune réponse cytotoxique n'ait été détectée, un effet protecteur contre le développement de métastases a été observé chez les souris ainsi immunisées<sup>15</sup>. Ces résultats

étant encourageants une telle molécule (Figure 4) administrée avec QS-21 a été testée sur des patientes atteintes du cancer du sein<sup>16</sup>.

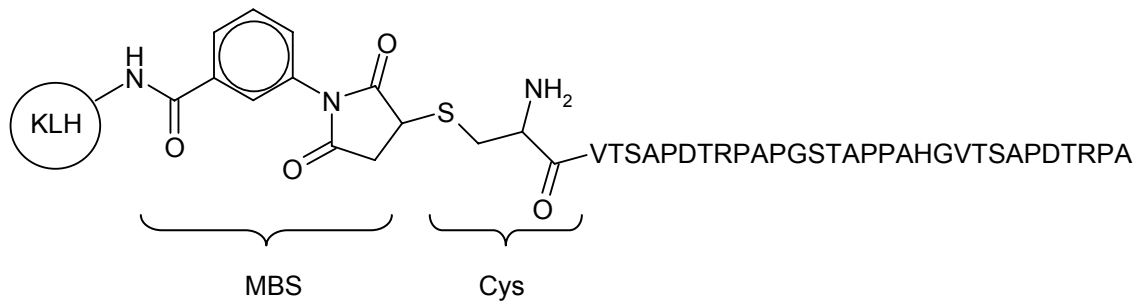


Figure 4 : Vaccin synthétique MUC1-KLH (Zhang *et al*<sup>15</sup>)

Ces résultats montrent que la présentation artificielle d'un peptide correspondant à une ou plusieurs unités du domaine VNTR de MUC1 permet d'induire une réponse immunitaire contre la forme tumorale de MUC1. De nombreux développements peuvent donc être envisagés pour optimiser la présentation de ces épitopes.

### **I. 3 . B . Approche saccharidique**

La connaissance des épitopes saccharidiques spécifiques de la forme tumorale de MUC1 a permis le développement d'une nouvelle approche basée sur ces antigènes<sup>17</sup>.

De même que précédemment, ces épitopes saccharidiques ont d'abord été couplés à des protéines porteuses telle que la KLH<sup>18</sup>. Cependant, l'utilisation de celles-ci dans la construction de vaccins synthétiques montre certains inconvénients. Tout d'abord, l'épitope qui est fixé sur la protéine porteuse ne représente qu'une faible partie de la construction. La réponse immunitaire peut donc aboutir à une faible production d'anticorps spécifiques de l'antigène comparé à ceux pouvant être dirigés contre la protéine elle-même. De plus, l'utilisation de protéines porteuses peut induire un phénomène de suppression épitopique. En effet la réponse immunitaire contre l'antigène fixé à la protéine peut être supprimée lorsque l'organisme est déjà immunisé contre celle-ci<sup>19</sup>. D'autre part, l'épitope est couplé au hasard sur la protéine porteuse donnant lieu à un ensemble de molécules hétérogènes de structure non définie.

Dans le cas de vaccins peptidiques, différentes alternatives ont été développées pour remplacer l'utilisation de la KLH.

Tam a ainsi mis au point les MAP (Multiple Antigenic Peptide)<sup>20</sup>. Les MAP sont composés d'un noyau de lysines branchées portant plusieurs fonctions amines sur lesquelles sont couplées plusieurs copies de l'épitope peptidique (Figure 5). Ceci conduit à l'obtention d'une structure bien définie dont le noyau de lysine ne représente plus qu'une faible proportion et est non immunogène.

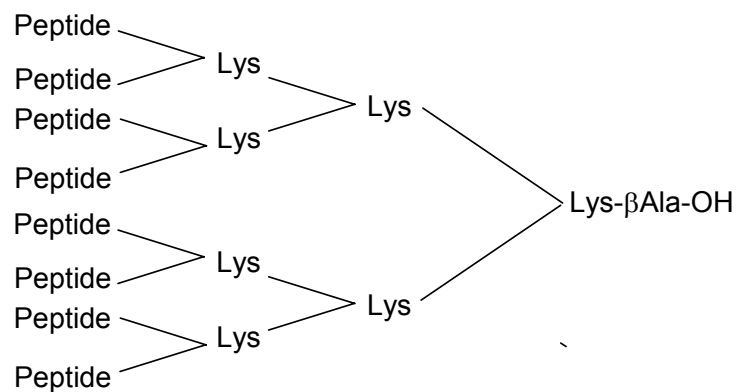


Figure 5 : MAP à 8 branches

Des constructions lipopeptidiques à base de Pam<sub>3</sub>Cys (S-[(R)-2,3-dipalmitoyloxypropyl]-N-palmitoyl-(R)-cystéine]) ont également montré leur efficacité en terme d'induction d'immunité humorale en l'absence de protéines porteuses telles que la KLH<sup>21</sup>. De plus, Berzofsky a montré que l'introduction d'un épitope T auxiliaire dans la construction d'un vaccin synthétique devrait permettre de stimuler de façon plus efficace le système immunitaire, induisant une réponse T-dépendante<sup>22</sup>.

Ces différentes stratégies ont été appliquées au cas des épitopes saccharidiques. Claude Leclerc et ses collaborateurs ont ainsi développé la synthèse des MAG (Multiple Antigenic Glycopeptide). Un premier MAG, « MAG : Tn-PV »<sup>23</sup> (Figure 6) contenant quatre branches composées de l'épitope PV (PolioVirus) comme épitope T-auxiliaire et de l'antigène Tn (Ser-GalNAc) a été synthétisé.

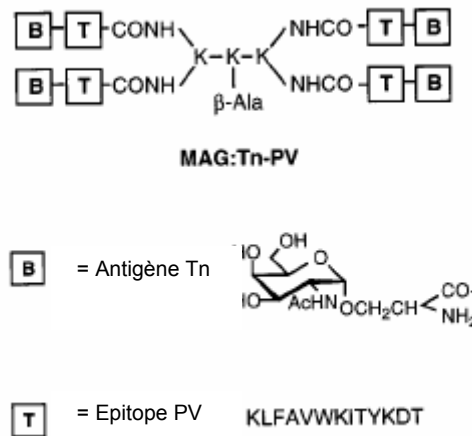


Figure 6 : MAG : Tn-PV (Bay *et al* <sup>23</sup>)

Cette construction est le premier exemple d'un vaccin synthétique induisant une réponse T-dépendante dirigée contre des épitopes saccharidiques. Lors d'essais d'immunisation cette molécule administrée avec l'alum comme adjuvant s'est avérée pouvoir induire une forte production d'anticorps capables de reconnaître des cellules tumorales exprimant l'épitope saccharidique Tn. D'autre part, dans le cas d'un traitement immunothérapeutique, l'administration d'un tel vaccin à des souris porteuses de cellules tumorales augmente la survie de celles-ci<sup>24</sup>.

Très récemment<sup>25</sup>, un nouveau type de construction composée d'une thréonine glycosylée par un GalNAc, d'un épitope T auxiliaire et d'un lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys s'est également montrée capable, en présence d'adjuvant QS21, d'induire une réponse humorale T-dépendante anti-GalNAc.

A partir de ces constructions, de nombreux développements peuvent être envisagés afin d'en augmenter l'immunogénicité ainsi que la spécificité de la réponse induite. On peut, en particulier, imaginer l'introduction de « clusters ».

La notion de « cluster » fait référence à l'état de glycosylation des mucines où les groupements saccharidiques peuvent être greffés sur plusieurs résidus de sérine ou de thréonine adjacents. Afin de mimer au mieux l'antigène naturel, Danishefsky et ses collaborateurs ont développé la synthèse de clusters constitués de 3 thréonines ou sérines sur lesquelles ont été fixés les épitopes saccharidiques. Ces clusters sont fonctionnalisés par une cystéine pour pouvoir être couplés à la protéine KLH par l'intermédiaire du MBS. Une

première construction [Thr(GalNAc)]<sub>3</sub>-KLH (figure 7) a ainsi été synthétisée. Des essais d'immunisation réalisés avec cette molécule ont montré la production d'anticorps anti-Tn capables de reconnaître les cellules tumorales portant l'épitope saccharidique Tn sous forme de cluster<sup>26</sup>.

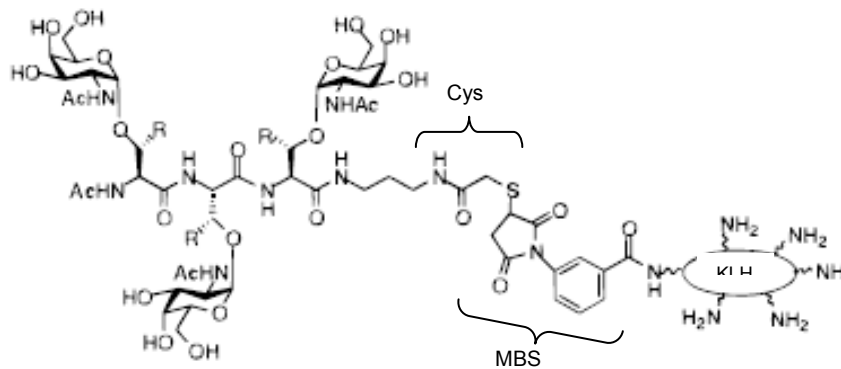


Figure 7 : [Thr(GalNAc)]<sub>3</sub>-KLH (Kuduk *et al*<sup>26</sup>)

Suivant le même raisonnement, un nouveau MAG, MAG : Tn<sub>3</sub>-PV, contenant des clusters à la place de l'unique résidu Ser-GalNAc du MAG : Tn-PV a été synthétisé (Figure 8). Des essais d'immunisation ont montré que MAG : Tn<sub>3</sub>-PV administré avec l'alum ou QS-21 induit une production d'anticorps supérieure à celle induite par MAG : Tn-PV<sup>27</sup> ou Tn<sub>3</sub>-KLH<sup>28</sup>. Ces anticorps reconnaissent les cellules tumorales et dans le cas d'un traitement immunothérapeutique la survie de souris ou de primates est nettement prolongée.

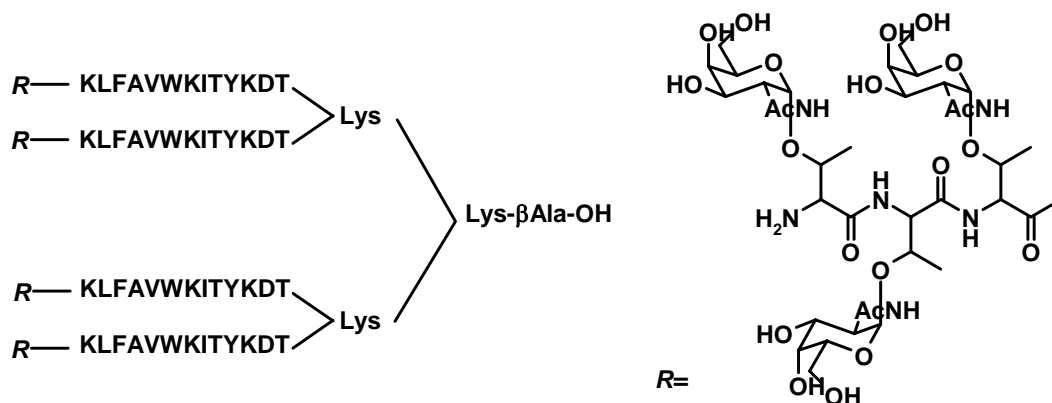


Figure 8 : MAG : Tn<sub>3</sub>-PV (Lo-Man *et al*<sup>27</sup>)

Un autre type de construction incluant deux clusters saccharidiques Tn<sub>3</sub>, l'épitope PADRE comme épitope T-auxiliaire et un épitope T-cytotoxique du CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) a également été synthétisée<sup>29</sup>. De même que précédemment, cette construction,

administrée avec l'adjuvant de Freund ou l'alum, s'est montrée capable d'induire la production d'anticorps anti-Tn reconnaissant les cellules tumorales portant l'épitope saccharidique Tn. La réponse T-cytotoxique n'a quant à elle pas été testée.

D'après ces résultats, le développement de vaccins synthétiques contenant les épitopes sacchariques spécifiques de MUC1 tumorale paraît être une voie adaptée pour le développement de l'immunothérapie anti-cancéreuse.

### **I.3.C. Approche mixte**

Selon les deux approches précédemment décrites, la présentation artificielle d'épitopes peptidiques ou saccharidiques représente une source potentielle de vaccins anticancéreux. Une troisième approche utilisant à la fois les épitopes saccharidiques et peptidiques peut être imaginée afin d'augmenter le potentiel immunogène de ces vaccins.

Dans cet objectif, Kunz et ses collaborateurs ont à de nombreuses reprises synthétisé de tels glycopeptides contenant différents marqueurs tumoraux peptidiques et saccharidiques<sup>30</sup>. En ce qui concerne MUC1, ceux-ci ont synthétisé différents glycopeptides représentant une partie de l'unité répétitive de MUC1 sur laquelle différents saccharides ont été couplés<sup>31</sup>. Cependant, ces glycopeptides n'ont en fait pas été testés du point de vue de l'immunogénicité. Dans le cas de l'induction d'une réponse T-cytotoxique, une molécule contenant un peptide de 12 acides aminés issu de la séquence MUC1 glycosylé par l'épitope Sialyl-Tn et lié par un bras espaceur à un épitope T cytotoxique issu de la toxine tétanique a été synthétisée et s'est montrée capable d'induire la prolifération de lymphocytes T cytotoxiques<sup>32</sup>.

Dans le cas de l'induction d'une réponse humorale, Livingston et ses collaborateurs ont comparé dans une même étude<sup>33</sup> l'immunogénicité des antigènes suivants couplés à la KLH :

- une thréonine glycosylée par le groupe saccharidique GalNAc (Antigène Tn),
- un cluster de trois thréonines glycosylées,
- un peptide de 30 acides aminés représentant 1 unité et demi du domaine VNTR de MUC1,
- un peptide de 30 acides aminés glycosylé par voie enzymatique sur 3 ou 5 sites.

Cette étude a montré qu'une construction présentant l'épitope thréonine-GalNAc sous forme de cluster est un meilleur immunogène en ce qui concerne l'induction d'anticorps dirigés contre GalNAc qu'une construction présentant cet épitope sous forme d'un unique résidu. Ceci avait déjà été montré dans le cas des MAG<sup>27</sup>.

Un deuxième résultat est que le glycopeptide MUC1 portant 3 ou 5 saccharides GalNAc est en fait le meilleur immunogène. Le dosage des sérums indique en effet une reconnaissance de l'antigène saccharidique Tn et des cellules tumorales MCF7 exprimant MUC1 d'intensité supérieure à celle observée avec les autres immunogènes. Ce résultat est primordial puisqu'il confirme la nécessité, pour la synthèse de vaccins synthétiques capable d'induire une réponse humorale anti-MUC1 tumorale de forte intensité, d'utiliser des glycopeptides et non des peptides ou des saccharides seuls.

Afin d'optimiser de tels vaccins une attention particulière doit être portée sur les sites qui doivent être glycosylés. L'introduction d'un groupement saccharidique sur la thréonine de la séquence APDTR, caractérisée à plusieurs reprises comme domaine immunodominant, semble en particulier avoir des effets intéressants.

Dans un premier temps, la thréonine de cette séquence était considérée comme ne pouvant pas être glycosylée ce qui pouvait expliquer l'immunodominance de ce domaine du fait d'une meilleure accessibilité à la séquence peptidique par le système immunitaire. Cependant, contrairement aux expériences de glycosylations enzymatiques réalisées *in vitro*, Müller et ses collaborateurs ont montré que tous les sites de MUC1, y compris la séquence APDTR, pouvaient être glycosylés *in vivo* dans le cas de la mucine présente dans le lait<sup>34</sup> et que tous les sites sont effectivement glycosylés dans le cas des cellules tumorales T47D<sup>35</sup>.

Karsten *et al*<sup>36</sup> ont alors étudié l'influence de la glycosylation par un motif GalNAc ou GalGalNAc sur l'antigénicité d'une séquence peptidique représentant une unité répétitive de MUC1 vis-à-vis d'une série d'anticorps monoclonaux anti-MUC1 spécifiques du déterminant DTR. Ils ont en particulier montré<sup>36b</sup> que les anticorps monoclonaux induits contre la mucine tumorale reconnaissent mieux le glycopeptide portant un résidu GalNAc sur la thréonine du déterminant APDTR que le peptide non glycosylé. Les anticorps monoclonaux dirigés contre la mucine normale ne sont quant à eux pas influencés par la glycosylation.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Mensdorff-Pouilly *et al*<sup>37</sup> qui ont montré que les anticorps issus du sérum de patientes atteintes du cancer du sein reconnaissent mieux des peptides glycosylés par un résidu GalNAc alors que les anticorps issus du sérum de



personnes saines ne sont pas influencés par l'état de glycosylation du substrat. Dans cette même étude, des patients ont été immunisés avec un peptide non glycosylé couplé à la KLH. Il a ensuite été observé que les anticorps issus des sérums de ces patients reconnaissent mieux un peptide non glycosylé qu'un peptide glycosylé.

Tout ceci semble indiquer que les glycopeptides, en particulier portant un résidu GalNAc sur la séquence APDTR, représentent mieux l'antigène tumoral qu'un peptide nu. De tels glycopeptides devraient donc être plus adaptés pour une thérapie vaccinale anti-cancéreuse. Cette différence d'antigénicité entre un peptide portant un résidu GalNAc et un peptide nu pourrait être due à un changement de conformation. En effet, des études structurales ont montré que le déterminant PDTR non glycosylé adopte une conformation en coude  $\beta$  de type 1<sup>38</sup> alors que lorsque la thréonine porte un résidu GalNAc, la conformation devient beaucoup plus rigide et étendue<sup>39</sup>.

L'ensemble de ces résultats montre l'influence de la glycosylation, en particulier par un résidu GalNAc, sur l'antigénicité de peptides issus de MUC1. Cependant, peu d'études ont été réalisées avec le résidu GalGalNAc. En particulier, à notre connaissance, aucune étude structurale n'a été réalisée avec un tel glycopeptide. D'autre part, à notre connaissance, mis à part l'étude de Livingston et ses collaborateurs<sup>33</sup> concernant différents antigènes comprenant l'épitope saccharidique GalNAc couplés à la KLH, aucune autre étude permettant de comparer l'immunogénicité de peptide glycosylés ou non glycosylés n'a été effectuée. Ceci est sans doute dû à la difficulté de produire les glycopeptides en quantité suffisante. De nombreux points restent donc à éclaircir quant au rôle de différents saccharides sur l'antigénicité ou l'immunogénicité de tels glycopeptides.

## **I.4. Conclusion**

Les différents résultats présentés ici montrent qu'il est possible d'induire une réponse immunitaire humorale efficace contre MUC1 en présentant de façon artificielle au système immunitaire des épitopes peptidiques, des épitopes saccharidiques, seuls ou sous forme de cluster, ou des épitopes glycopeptides.

Parmi ces trois approches, l'approche mixte visant à présenter des glycopeptides semble être la plus efficace. Afin de se rapprocher de l'antigène tumoral, les glycopeptides doivent en particulier être glycosylés sur le déterminant APDTR.

Les MAP ou les MAG permettant de présenter de façon branchée différentes copies d'un même antigène ont également montré leur supériorité.

Notre objectif est donc la mise au point d'un vaccin synthétique contenant plusieurs copies du peptide Muc1 glycosylé assemblées sous une présentation branchée. Nous souhaitons que cette approche soit modulaire afin de pouvoir assembler facilement des peptides de différentes longueurs ou différemment glycosylés ou différents épitopes T-auxiliaires dans un ordre comme dans un autre. La synthèse d'un tel vaccin se fera donc en deux étapes : la synthèse des différents modules peptidiques glycosylés et leur assemblage. Plusieurs molécules pourront ainsi être préparées et permettront de déterminer le meilleur candidat.

Afin de réussir la synthèse de telles molécules, deux savoir-faire doivent donc être acquis : la synthèse de glycopeptides et la ligation chimique qui semble tout à fait appropriée pour l'assemblage modulaire des différents synthons.

## **II . La ligation chimique**

### **II . 1 . Limites de la SPPS et définition de la ligation chimique**

Grâce aux avancées prodigieuses réalisées au cours du dernier siècle en synthèse peptidique, la synthèse de protéines est aujourd'hui possible.

L'un des développements les plus remarquables est la synthèse sur support solide (SPPS) introduite par Merrifield en 1963 pour la synthèse d'un tetrapeptide<sup>40</sup>. La SPPS a en particulier permis l'automatisation de la synthèse peptidique. Le développement de nouvelles résines<sup>41</sup>, de nouveaux agents de couplages<sup>42</sup>, de nouveaux groupes protecteurs<sup>43</sup> et de nouveaux bras ont augmenté l'efficacité de la SPPS. Cependant, celle-ci reste dans la plupart des cas limitée à des peptides d'une cinquantaine de résidus. Des peptides et protéines de taille plus importante peuvent éventuellement être synthétisés mais ceci demande une optimisation au cas par cas et ne peut donc pas être réalisé en routine.

La stratégie convergente visant alors à condenser par une liaison amide deux fragments peptidiques protégés ou partiellement déprotégés en solution ou sur support solide est une des stratégies utilisées pour la synthèse de protéines supérieure à 50 résidus. La GFP (Green Fluorescent Protein) a ainsi été synthétisée en solution à partir de 26 fragments synthétisés sur support solide<sup>44</sup>. La stratégie convergente est également la plus couramment utilisée dans le milieu industriel<sup>45</sup>. Toutefois, cette stratégie, laborieuse, représente plusieurs inconvénients à savoir la difficulté de purifier les fragments protégés, leur faible solubilité dans les solvants aqueux ou organiques et une racémisation de l'acide aminé C-terminal au niveau du site de couplage.

La ligation chimique consistant à condenser en milieu aqueux et de façon chimio-sélective des fragments peptidiques non protégés spécifiquement fonctionnalisés (Figure 9) a permis de surmonter ces difficultés.

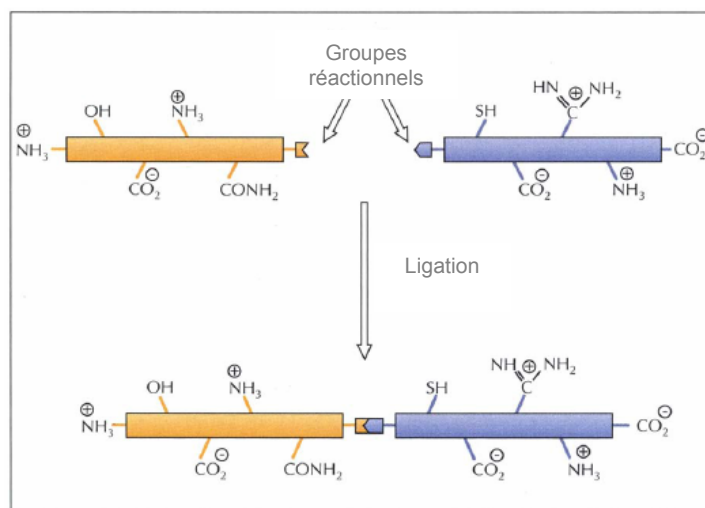


Figure 9 : Principe de la ligation chimique (Muir<sup>46</sup>)

Schnölzner et Kent sont les premiers à avoir utilisé la ligation chimique, déjà connue pour la synthèse de conjugués biologiques, pour la synthèse d'une protéine. L'HIV protéase a ainsi été synthétisée par condensation de deux fragments par une liaison thioester<sup>47</sup>. La ligation chimique présente de nombreux avantages. Entre autres, elle dispense de l'utilisation de groupes protecteurs ou d'agent de couplage, elle s'effectue en milieu aqueux et elle permet l'introduction d'acides aminés non naturels ou la formation de structures non naturelles telles que les dendrimères.

Cette nouvelle méthode a donc connu de nombreux développements et a permis de nombreux succès dans la synthèse totale ou la semi-synthèse de protéines<sup>48</sup> ou de glycoprotéines<sup>49</sup> de tailles de plus en plus importante (Figure 10).

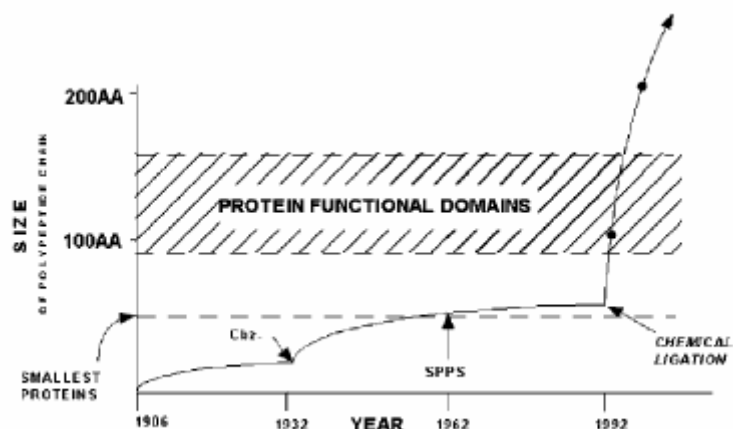


Figure 10 : Evolution de la taille des peptides et protéines accessibles par synthèse chimique (Dawson et Kent<sup>48a</sup>)

## II. 2 . Les différentes méthodes de ligation

En fonction des groupes réactionnels greffés sur chaque partenaire, on obtient différents types de liaisons au site de ligation. Ces différentes méthodes de ligation sont répertoriées dans les paragraphes suivants.

### II . 2 . A . Oximes et hydrazones

Les aldéhydes, de nature électrophile unique par rapport aux chaînes latérales des peptides qui sont de nature nucléophile, réagissent avec les groupes aminoxy, hydrazide ou hydrazine selon une réaction de condensation catalysée en milieu acide pour former des liaisons oxime ou hydrazone (Schéma 1).

Les aminoxy, hydrazide ou hydrazine sont beaucoup plus nucléophiles que les thiols ou les amines des chaînes latérales. De plus, au pH de la réaction, ces groupes qui ont des pKa faibles (~3,5 à 5) sont déprotonés alors que les chaînes latérales sont protonées. La réaction est donc chimiosélective.

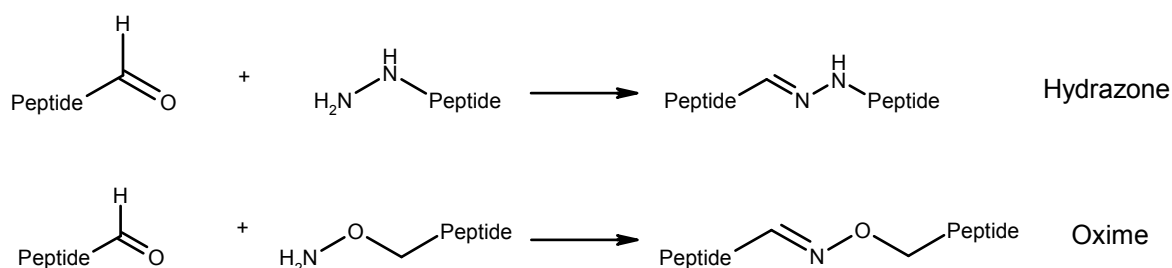


Schéma 1 : Ligation par liaison oxime et hydrazone

La ligation par la liaison hydrazone est la première ligation non-native à avoir été étudiée<sup>50</sup>. Afin de prouver son efficacité, une protéine recombinante G-CSF (Granocyte Colony Stimulating Factor) a été spécifiquement coupée par voie enzymatique entre deux résidus lysine et sérine puis les deux fragments ont été fonctionnalisés et condensés pour reformer la G-CSF (Schéma 2)<sup>51</sup>.

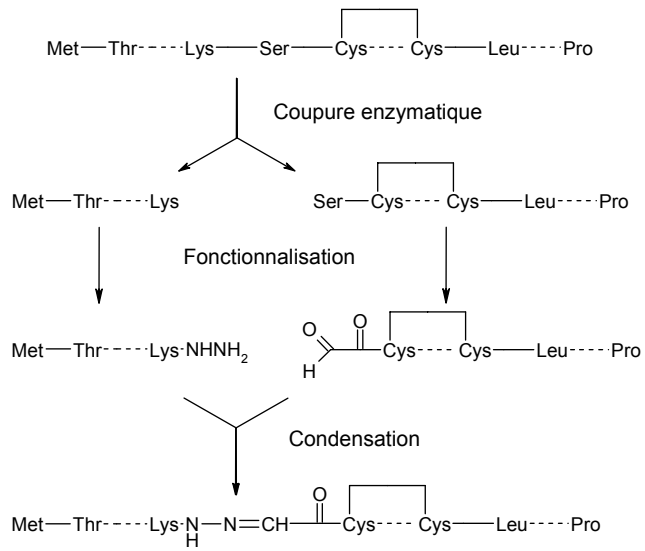


Schéma 2 : Synthèse d'un analogue de la G-CSF par liaison hydrazone (d'après Gaertner *et al*<sup>51</sup>)

Mise au point par Rose lors de la synthèse d'une protéine dendrimère d'environ 20 kDa<sup>52</sup>, la ligation chimique par liaison oxime a été fréquemment utilisée. On peut à titre d'illustration citer l'exemple de la synthèse d'analogues de l'oxytocine, une hormone neurohypophysaire de neuf résidus. Dans ces analogues, le pont disulfure a été remplacé par une liaison oxime formée par condensation intramoléculaire entre un résidu aminoxy et une sérine oxydée tous deux couplés sur les chaînes latérales de l'acide diaminopropionique (Dap) introduits dans la séquence à la place des deux cystéines (Schéma 3)<sup>53</sup>.

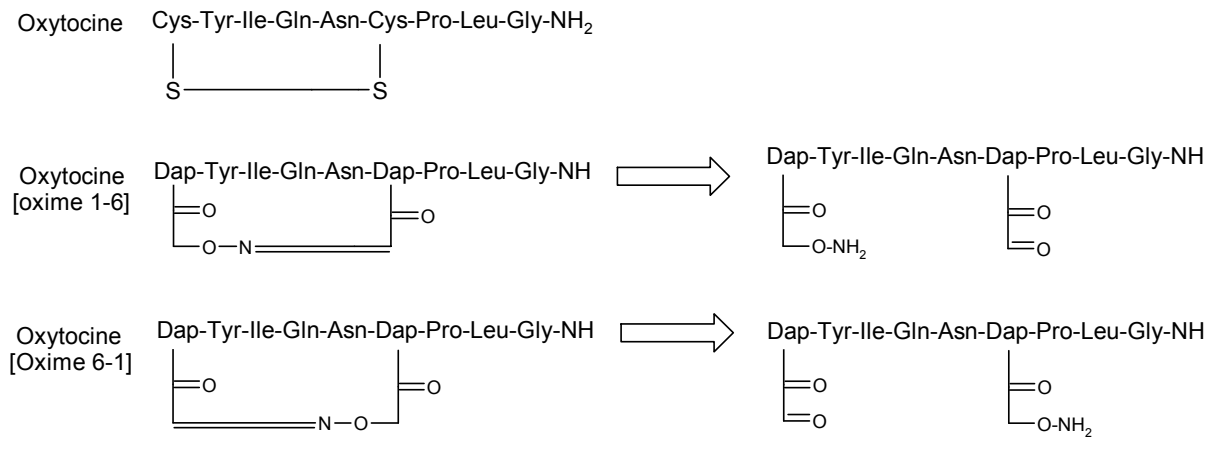


Schéma 3 : Synthèse de l'oxytocine par ligation oxime (d'après wahl et Mutter<sup>53</sup>)

## II. 2. B. Thioéther et thioester

Deux autres types de ligation faisant cette fois intervenir un bromoacétate N-terminal comme électrophile ont été développés. Les thiocarboxylates ou les thiols peuvent réagir avec le bromoacétate selon une réaction de substitution nucléophile pour donner une liaison thioester ou thioether (Schéma 4).

De même que pour la liaison oxime ou hydrazone, la ligation thioester est chimiosélective. En effet, au pH de la réaction (pH 5-6), les cystéines (pKa ~8) ou les amines sont protonées, contrairement au thiocarboxylate (pKa ~3) qui réagit alors beaucoup plus rapidement.

La ligation thioéther qui s'effectue à pH neutre ou basique est quant à elle incompatible avec la présence de résidus Cystéine.

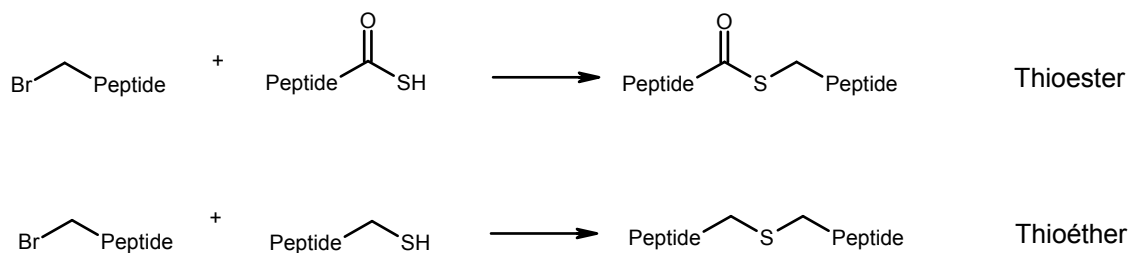
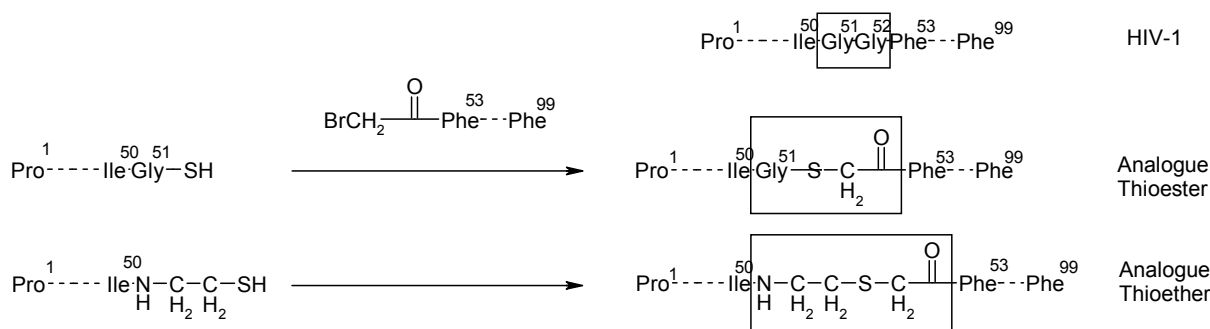


Schéma 4 : Ligation par liaison thioester et thioéther

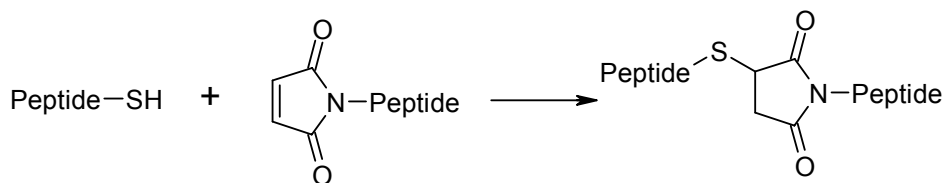
Ces deux types de ligation ont été utilisés pour la synthèse de l'HIV-1 protéase. Cette protéine de 99 acides aminés est un bon candidat pour la synthèse par ligation chimique. Elle présente au milieu de sa séquence une région flexible contenant deux glycines adjacentes (résidus 51 et 52) qui n'intervient pas dans l'activité enzymatique. Il est donc facilement envisageable d'introduire une liaison thioéther ou thioester au niveau de ces deux glycines. Ceci nécessite la fonctionnalisation et la condensation de deux fragments peptidiques d'une cinquantaine d'acides aminés pouvant être synthétisés par SPPS.

Le fragment N terminal 1-50 a été fonctionnalisé coté C-terminal par un thiocarboxylate ou un thiol et a été condensé avec le fragment C-terminal 53-99 fonctionnalisé coté N-terminal par un bromoacétate pour former respectivement au site de ligation une liaison thioester<sup>47</sup> ou thioéther<sup>54</sup> (Schéma 5).



**Schéma 5** : Synthèse des analogues thioéther et thioester de l'HIV-1 protéase (d'après Schnölzner *et al*<sup>47</sup>, Englbretsen *et al*<sup>54</sup>)

Une liaison thioéther peut également être obtenue par addition d'un peptide thiol sur un peptide maléimide (Schéma 6). Ce type de liaison a par exemple été utilisé par Mutter et ses collaborateurs<sup>55</sup> pour la synthèse de TASP (Template Assembled Synthetic Protein) que nous discuterons par la suite.



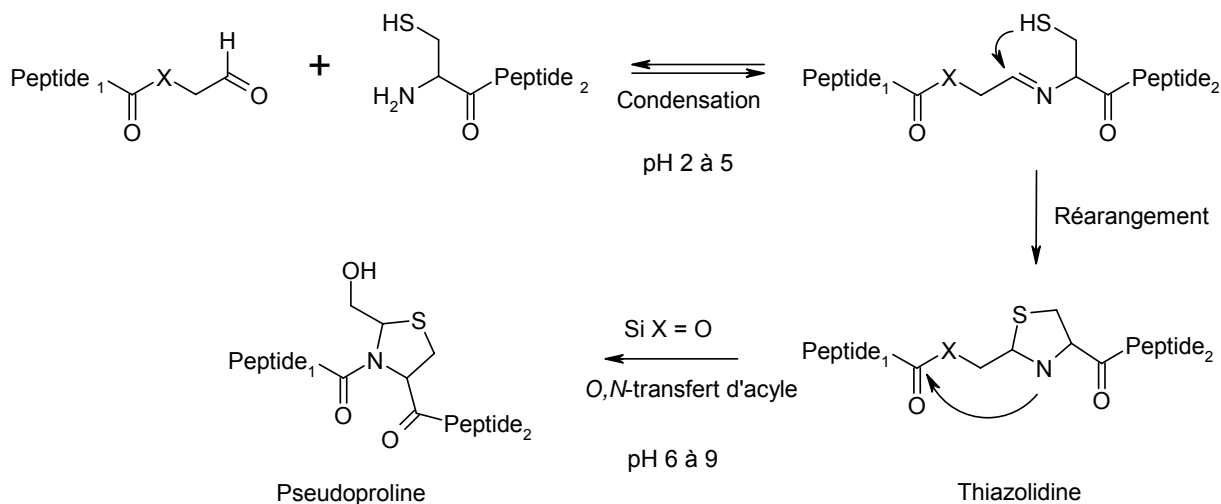
**Schéma 6** : Formation d'une liaison thioéther entre un peptide thiol et un peptide maléimide.

## **II. 2. C. Thiazolidine et pseudoproline**

La ligation par des liaisons thiazolidine ou pseudoproline a été développée par Tam et ses collaborateurs<sup>56</sup>.

La thiazolidine est formée par condensation, à pH acide (2 à 5), d'un aldéhyde avec une cystéine suivie d'un réarrangement intramoléculaire (Schéma 7). Dans le cas d'un ester méthylaldéhyde (X = O), contrairement à l'amido méthylaldéhyde (X = N), la thiazolidine obtenue peut subir à pH plus élevé (6 à 9) un *O,N*-transfert d'acyle pour former une pseudoproline



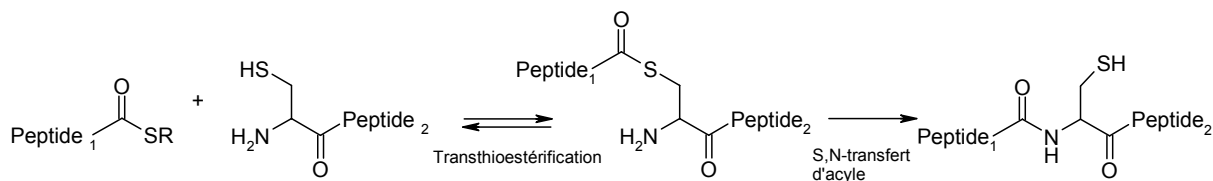


**Schéma 7** : Mécanisme réactionnel de la formation des liaisons pseudoproline et thiazolidine (d'après Liu *et al*<sup>56</sup>).

La ligation par une liaison pseudoproline a été utilisée avec succès pour la synthèse de l'HIV-1 protéase où la proline 39 a été remplacée par une pseudoproline obtenue par ligation entre le fragment 1-38 fonctionnalisé par un aldéhyde et le fragment 40-99 portant une cystéine coté N-terminal<sup>57</sup>.

## II. 2. D. La ligation native via un peptide thioester

Les différentes ligations décrites précédemment aboutissent à la formation au site de ligation d'une liaison non naturelle ou une pseudoproline. La ligation native développée par Kent et ses collaborateurs permet quant à elle d'obtenir une liaison amide (Schéma 8)<sup>58</sup>. Cette stratégie repose sur la labilité de la liaison thioester et sa capacité d'acylation intramoléculaire. Elle consiste en un échange intermoléculaire entre un thioester C-terminal et le thiol d'une cystéine N-terminale suivie d'un réarrangement intramoléculaire par transfert d'acyle.



**Schéma 8** : Ligation native via un peptide thioester (d'après Dawson *et al*<sup>58</sup>)

Le premier exemple d'utilisation de cette ligation pour la synthèse d'une protéine est la synthèse de l'interleukin 8, une protéine de 72 acides aminés, obtenue par ligation entre le fragment 1-33 et le fragment 34-72<sup>58</sup>.

L'« expressed protein ligation » est une extension de cette ligation native. Elle consiste à synthétiser un peptide thioester par voie recombinante. Ce peptide réagit ensuite avec un peptide cystéine synthétique selon le même processus que la ligation native<sup>59</sup>.

La synthèse recombinante du peptide thioester est basée sur l'utilisation des « inteins ». Les « inteins » sont des fragments internes de précurseurs de protéines capables de catalyser leur excision et la ligation entre les deux fragments adjacents selon un mécanisme intramoléculaire appelé « protein splicing ». Ce mécanisme implique la formation d'un thioester entre le fragment adjacent situé côté N-terminal et l'« intein ». L'obtention d'un peptide thioester par synthèse recombinante consiste donc à faire exprimer la protéine d'intérêt sous forme d'une protéine de fusion avec une « intein » mutée. La mutation permet de stopper le mécanisme de « splicing » à la formation du thioester intermédiaire. La protéine d'intérêt est ensuite séparée de l'« intein » par transthioestérification et peut alors réagir avec un peptide cystéine synthétique selon le mécanisme de ligation native (Schéma 9). Les deux dernières étapes de transthioestérification et de ligation ont lieu simultanément.

L'intérêt de cette ligation est qu'elle permet la ligation entre un peptide synthétique limité en taille et un peptide ou une protéine de taille beaucoup plus importante.

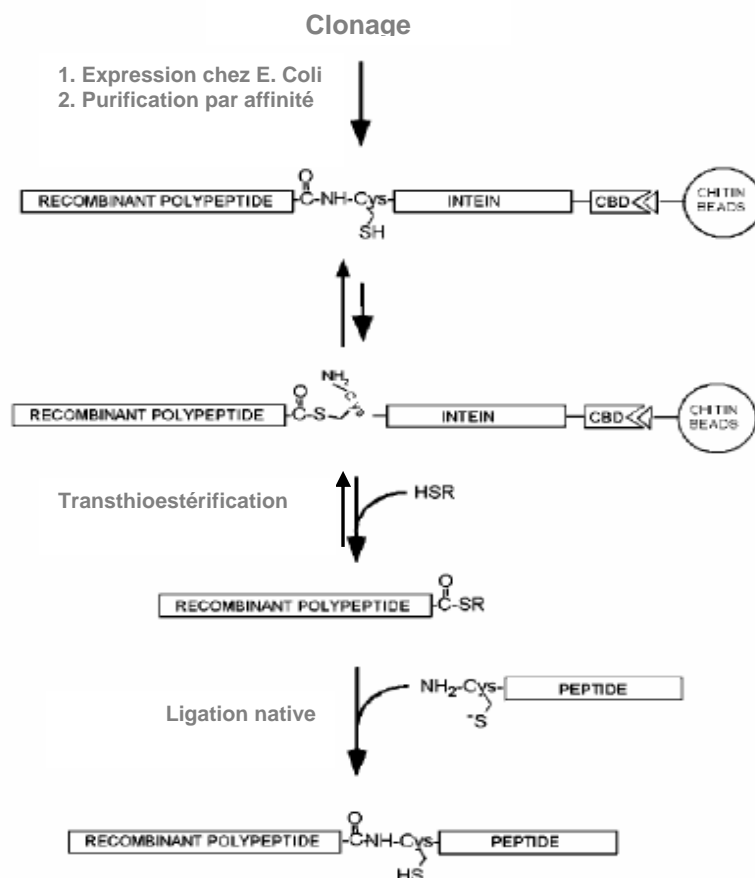


Schéma 9 : Expressed protein ligation (dans Dawson et Kent<sup>48a</sup>).

## II . 2 . E . La ligation native *via* la réaction de Staudinger

La ligation de Staudinger, développée récemment par Bertozzi<sup>60</sup> et Raines<sup>61</sup>, permet elle aussi d'obtenir une liaison amide au site de ligation mais elle ne nécessite pas la présence de cystéine en position N-terminale du peptide C-terminal. Il s'agit de la réaction entre un peptide phosphinothioester (**1**), obtenu par déplacement nucléophile d'un peptide thioester par un phosphinothiol, avec un peptide azide (**2**) (Schéma 10). Le mécanisme réactionnel supposé fait intervenir un iminophosphorane (**3**) comme intermédiaire réactionnel qui subit un S,N transfert d'acyle pour former l'aminophosphonium (**4**) qui est alors hydrolysé. Cette ligation a été utilisée par Raines pour la synthèse de la RNase<sup>62</sup>.

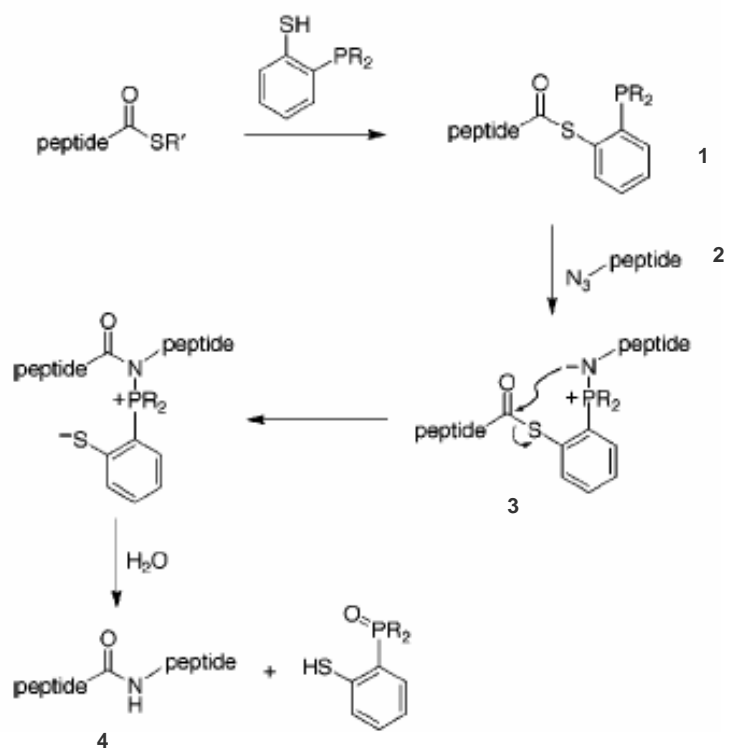


Schéma 10 : Schéma de réaction de la ligation de Staudinger (Nilson *et al*<sup>61</sup>)

## II. 3 . La ligation en tandem

Les différents types de ligation décrits ci-dessus et résumés dans le tableau 1, permettent le couplage de deux fragments peptidiques synthétiques. Sauf dans le cas de l'« expressed protein ligation » où l'un des deux fragments est obtenu par synthèse recombinante, la taille des protéines obtenues reste limitée par la taille des fragments peptidiques pouvant être synthétisés.

La ligation en tandem consiste à étendre la ligation chimique à la synthèse de protéines de taille plus importante en réalisant plusieurs ligations pour assembler trois fragments ou plus.

Type de ligation	Nucléophile	Electrophile	Condition de pH
Oxime	Aldehyde	Aminoxy	4,5-5,5
Hydrazone	Aldehyde	Hydrazide/Hydrazine	4,5-5,5
Thioéther	Bromoacétyl	Thiol	6-8
Thioester	Bromoacétyl	Thioacide	3-7
Thiazolidine	Aldéhyde	Cystéine N-terminale	2-5
Pseudoprolin	Réarrangement thiazolidine		6-9
Ligation native	Thioester	Cystéine N-terminale	7-8

Tableau 1 : Différents types de ligation

Le premier exemple de ligation en tandem est la synthèse du facteur de transcription cMyc-cMax<sup>63</sup>. Les deux protéines cMyc et cMax forment un hétérodimère non covalent stable capable de se fixer sur l'ADN et d'activer la transcription. Afin de faciliter l'étude de cette interaction un hétérodimère covalent des protéines cMyc et cMax tronquées a été assemblée par trois ligations (Schéma 11). Dans un premier temps, les fragments C et N-terminaux de cMyc et cMax ont été couplés par une ligation thioester. Après purification de chacun des monomères, l'hétérodimère a été formé par ligation oxime. Le dimère covalent ainsi synthétisé a montré la même affinité pour l'ADN que le dimère non covalent.

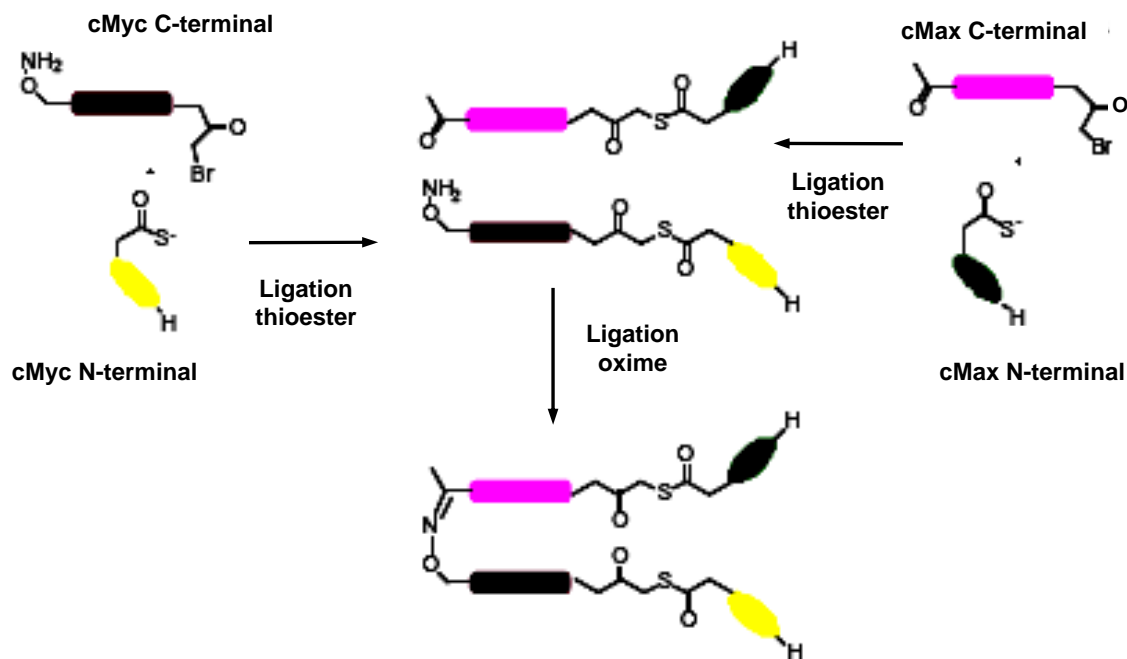


Schéma 11 : Synthèse de l'hétérodimère covalent cMyc-cMax par trois ligations (Canne *et al*<sup>63</sup>)

Cet exemple montre l'efficacité de l'utilisation de plusieurs ligations orthogonales pour parvenir à la synthèse de protéines de taille importante. Selon le même principe, plusieurs autres synthèses ont été réalisées.

Tam a par exemple mis au point une stratégie de synthèse avec trois fragments couplés par une liaison pseudoproline et une liaison native (Schéma 12)<sup>64</sup>. Les trois fragments mis en jeu sont le fragment N-terminal (N) fonctionnalisé côté C-terminal par un aldéhyde, le fragment interne (M) fonctionnalisé côté N-terminal par une cystéine et côté C-terminal par un thioester et le fragment C-terminal (C) fonctionnalisé par une cystéine. L'orthogonalité des deux ligations repose ici sur les conditions de pH. La première étape est la formation d'une thiazolidine entre le fragment N et le fragment M. Cette réaction s'effectue à pH acide, la ligation native inter ou intra-moléculaire pouvant avoir lieu avec le fragment M est donc inhibée. Après purification du fragment NM, celui-ci est couplé au fragment C par une ligation native. Cette deuxième étape s'effectue à pH légèrement basique permettant également le réarrangement de la liaison thiazolidine pour former une pseudoproline.

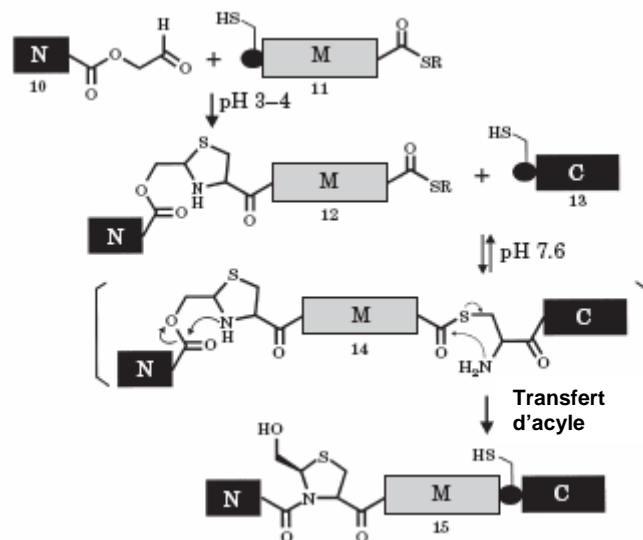


Schéma 12 : Stratégie de double ligation par liaison pseudoproline et thioester (Miao et Tam <sup>64</sup>)

La synthèse « one-pot » de la crambine réalisée récemment par Kent avec deux ligations natives<sup>65</sup> est également intéressante. Contrairement aux deux exemples précédents les deux ligations sont ici identiques, l'orthogonalité de la stratégie réside dans la protection temporaire d'une des fonctions réactives.

Parmi les cinq résidus cystéine de la crambine, les résidus choisis comme sites de ligation sont les résidus 16 et 32. La première étape (Schéma 13) est la ligation entre le résidu 16-31 fonctionnalisé par un thioester et le résidu 32-46. Lors de cette ligation la cystéine 16 est protégée sous forme de thiazolidine. La deuxième étape consiste à déprotéger la cystéine 16 et à introduire dans le milieu réactionnel le fragment 1-15 fonctionnalisé par un thioester, pour former la deuxième liaison native.

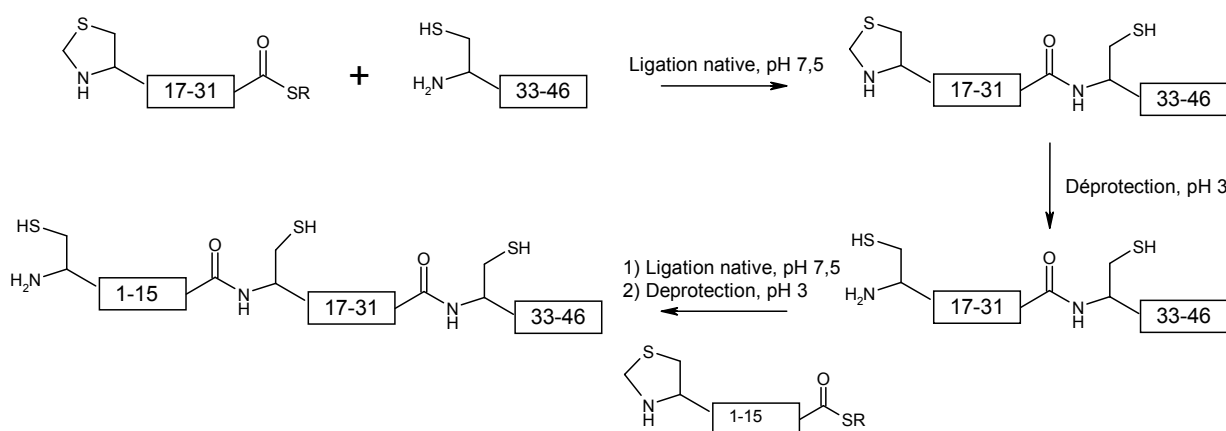


Schéma 13 : Synthèse de la crambine(d'après Bang et al<sup>65</sup>)

L'intérêt de cette stratégie, outre le fait qu'elle ne nécessite pas de purification intermédiaire, est la possibilité de l'appliquer pour la synthèse de protéines plus longues. Il suffirait de répéter autant de fois que nécessaire la ligation avec un fragment fonctionnalisé côté C-terminal par un thioester suivie de la déprotection de la cystéine N-terminale de ce fragment.

L'exemple le plus remarquable de synthèse de protéine par ligation chimique est la synthèse de la SEP (Synthetic Erythropoiesis Protein) de 51 kDa réalisée par Kochendoerfer et ses collaborateurs<sup>66</sup>. L'Erythropoéitine est une hormone glycosylée qui régule la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules érythropoïétiques. Cette glycoprotéine possède un squelette peptidique de 166 résidus et quatre sites de glycosylation. La SEP qui a été synthétisée contient le même squelette peptidique que l'Erythropoéitine naturelle. Deux polymères branchés de longueur définie et possédant huit charges négatives ont été fixés sur deux des sites de glycosylation de ce squelette. La synthèse a été réalisée à partir de quatre fragments peptidiques (Schéma 14). La première étape a consisté à condenser les polymères sur les fragments N- et C-terminaux par une liaison oxime. Les quatre fragments ont ensuite été condensés par ligation native pour former le squelette peptidique.

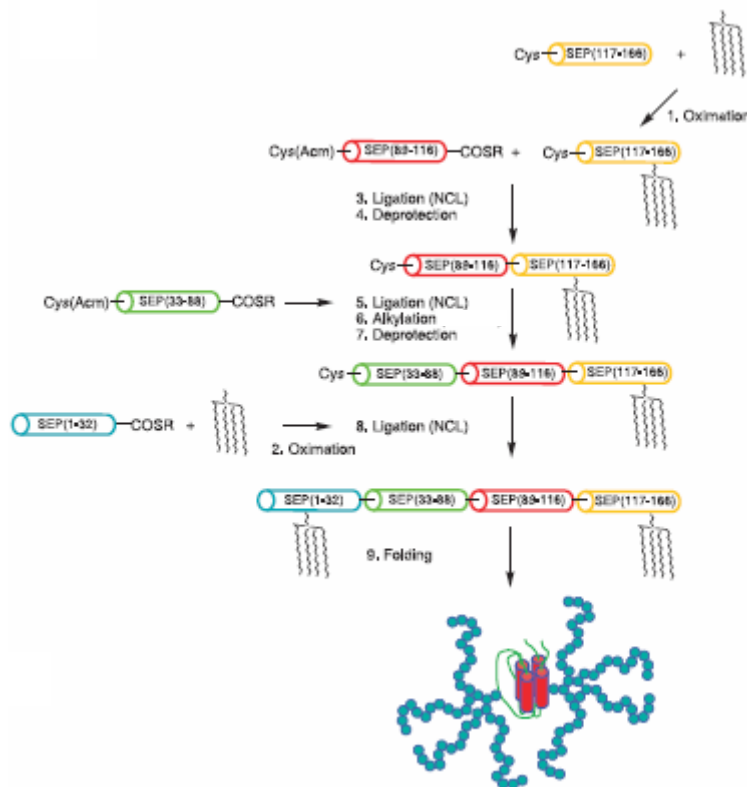


Schéma 14 : Synthèse de la SEP (Synthetic Erythropoiesis Protein) (Kochendorfer *et al*<sup>66</sup>)



Lors d'études réalisées *in vitro* et *in vivo*, la SEP a montré une activité similaire à celle de l'Erythropoétine naturelle mais avec une durée d'action significativement augmentée.

Les différents exemples cités dans cette partie montrent l'étendue des possibilités qu'offre la ligation chimique pour la synthèse de protéines. La combinaison de différentes ligations orthogonales, l'utilisation éventuelle de groupes protecteurs, sans oublier l'« expressed protein ligation » qui permet l'obtention de fragment de taille importante permet d'imaginer de nombreuses voies de synthèses adaptables suivant la protéine cible.

## **II.4. Utilisation de la ligation chimique pour la synthèse de dendrimères**

La ligation en tandem que nous venons de décrire consiste à réaliser plusieurs ligations orthogonales à la suite les unes des autres pour réaliser la synthèse de protéines de taille importante. La ligation chimique a également été utilisée pour la synthèse de dendrimères tels que les TASP (Template Assembled Synthetic Peptide) ou les MAP où plusieurs copies d'un peptide sont couplés simultanément sur une matrice possédant plusieurs fonctions réactives identiques.

### **II.4.A. Les TASP**

Le concept de TASP a été introduit par Mutter et ses collaborateurs pour contourner le problème du repliement des protéines<sup>67</sup>. Selon cette approche, des unités peptidiques ayant une structure secondaire inhérente sont fixées sur une matrice de topologie définie, permettant ainsi le repliement des peptides selon une structure tertiaire. Pour la synthèse de telles protéines, la ligation chimique est une bonne alternative à la stratégie convergente utilisant des peptides protégés. Ainsi plusieurs synthèses de TASP basées sur des liaisons thioester<sup>68</sup> thioéther<sup>69,55</sup>, thiazolidine<sup>70</sup> ou oxime<sup>71</sup> ont été réalisées.

Dans ce dernier exemple Koechendorfer et ses collaborateurs ont appliqué le principe des TASP pour l'étude du canal ionique MscL (Mechanosensitive channel Large) de

*Mycobacterium tuberculosis*. Celui-ci est constitué d'un peptide de 151 acides aminés dont la structure cristalline révèle deux régions adoptant une structure secondaire hélicoïdale arrangées sous forme d'homopentamère. Le domaine C-terminal 103-151 en solution à pH neutre ne présente aucune structure secondaire. Par contre, la fixation de ce peptide fonctionnalisé par un aminoxy sur une matrice portant cinq fonctions cétone induit une structure secondaire.

Dans une étude récente Dumy et ses collaborateurs ont également utilisé la liaison oxime pour la fixation d'un ligand de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sur un RAFT (Regioselectively Adressable Functionalized Template)<sup>72</sup>. Les RAFT sont des décapeptides cycliques contenant deux types de site de fixation protégés de façon orthogonales et orientés vers les deux faces opposées du squelette peptidique<sup>73</sup>. A partir des deux RAFT (1) et (2) dont les chaînes latérales des lysines d'une face sont protégées par des Boc et celles de l'autre face protégées par des Alloc (Schéma 15), Dumy et ses collaborateurs ont préparé les composés de type (3) et (4) sur lesquels le cyclopeptide c[RGFfV-1] reconnu par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été condensé par des liaisons oxime afin d'obtenir les composés de type (5).

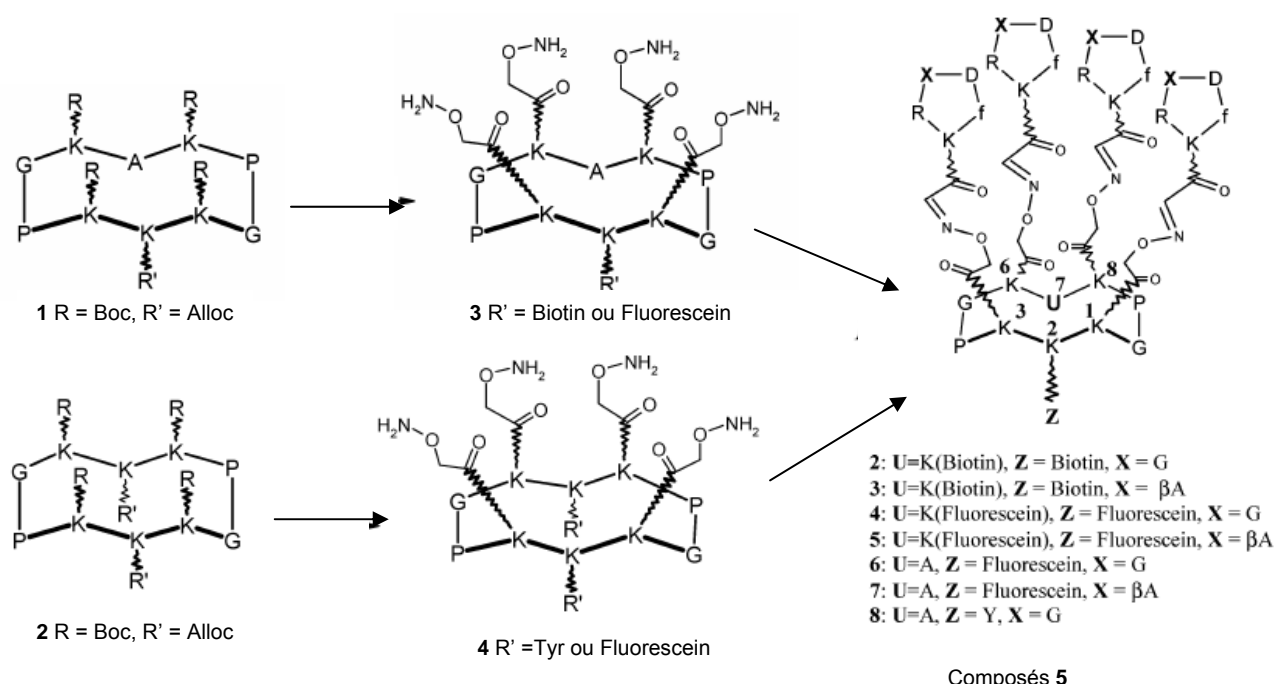


Schéma 15 : Synthèse de RAFT (Boturyn *et al*<sup>72</sup>)

## II.4.B. Les MAP

Nous avons vu précédemment que le concept de MAP était un bon modèle pour la synthèse de vaccins synthétiques. Cependant leur synthèse par SPPS conduit le plus souvent à des molécules non homogènes du fait de l'accumulation de couplages incomplets. La formation de MAP par ligation chimique permet de s'affranchir de ces problèmes.

Tam et ses collaborateurs<sup>74</sup> qui avaient introduit le principe des MAP ont utilisé la liaison oxime, hydrazone et thiazolidine pour la synthèse de MAP à quatre branches. Une matrice constituée de deux lysines branchées fonctionnalisées sur l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> et le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> par des cétoaldéhydes a été synthétisée. A partir de cette matrice, trois MAP ont été préparés par ligation chimique avec des peptides aminooxy, hydrazide ou cystéine pour former des liaisons oxime, hydrazone ou thiazolidine.

De la même façon, Rose et ses collaborateurs<sup>75</sup> ont synthétisé des MAP à huit branches avec des liaisons oxime (Schéma 16) ou hydrazone à partir d'un noyau de huit lysines branchées et de l'insuline porcine fonctionnalisée par une fonction aminooxy ou hydrazide.

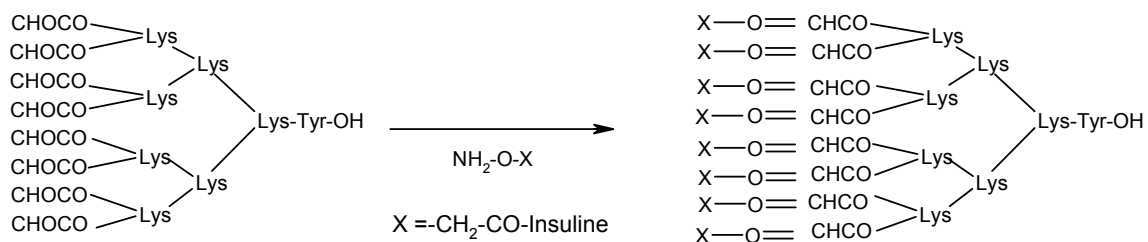
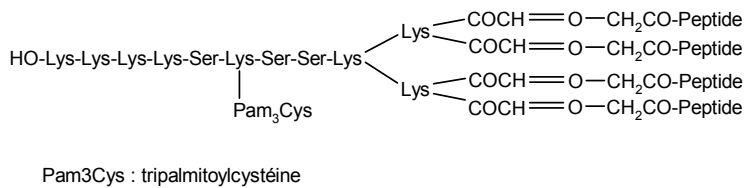


Schéma 16 : Formation d'une octaoxime avec l'insuline porcine ( Rose *et al*<sup>75</sup>)

Selon ce principe de MAP obtenu par ligation chimique, deux candidats vaccins ont été synthétisés par liaison oxime. L'un possède quatre copies d'un peptide issu du virus de la grippe (Figure 11 a)<sup>76</sup> et l'autre contient quatre copies d'un peptide constitué des épitopes B, T cytotoxique et T auxiliaire de la protéine de la malaria (Figure 11 b)<sup>77</sup>. Les deux constructions se sont révélées être de très bon immunogènes chez la souris<sup>76</sup> ou en étude clinique de phase I<sup>77</sup>.



a) Peptide = PKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQT  
 b) Peptide = T<sub>1</sub>BT\*  
 T<sub>1</sub> : Epitope T cytotoxique  
 DPNANPNVDPNANPNV  
 B : Epitope B (NANP)<sub>3</sub>  
 T\* : Epitope T auxiliaire  
 EYLNKIQNLSLSTEWSPCSVT

**Figure 11** : Vaccins synthétiques sous forme de MAP obtenu par ligation oxime  
 a : vaccin contre la grippe(d'après Zeng et al.<sup>76</sup>), b : vaccin contre la malaria (d'après Nardin *et al.*<sup>77</sup>)

Les études précédentes de TAM<sup>74</sup> et Rose<sup>75</sup> avaient déjà montré la stabilité de la liaison oxime sur une large gamme de pH autour du pH physiologique. Ces exemples de vaccins synthétiques montrent ici la compatibilité de cette liaison avec l'induction *in vivo* d'une réponse immunitaire. De plus, les précédentes synthèses présentées dans ce chapitre ont pu montrer l'efficacité de cette ligation<sup>63, 66, 72, 75</sup>. Dans le cadre de ce travail de thèse concernant la synthèse modulaire d'un vaccin antitumoral anti-MUC1, la liaison oxime nous semble donc être un bon candidat pour l'assemblage des différents modules.

Dans le paragraphe qui suit nous nous intéresserons à la synthèse des deux partenaires oximes et aldéhydes nécessaires à la synthèse de liaison oxime. Nous nous intéresserons également à la synthèse de peptide hydrazide nécessaire à la synthèse de liaison hydrazone. Celle-ci est en effet facilement réductible et permettrait ainsi d'obtenir un produit plus flexible qui ne présente plus l'isomérisation *cis* ou *trans* de la double liaison.

## II.5. Ligation oxime et hydrazone : Synthèse de peptides aldéhyde, aminooxy, hydrazide et hydrazine

### II.5.A. Synthèse de peptides aldéhyde

De nombreuses méthodes ont été développées pour la synthèse de peptides aldéhydes C- ou N-terminaux<sup>78</sup>. L'objectif de ce paragraphe est de recenser les différents principes utilisés pour ces synthèses.

#### II.5.A.a. Oxydation d'un 2-aminoalcool ou d'un diol

L'oxydation des 2-aminoalcools par  $\text{NaIO}_4$  est une réaction bien connue en chimie organique. Cette réaction peut être facilement appliquée à la synthèse de peptide aldéhyde en incluant dans la séquence une sérine ou une thréonine N-terminale. Ce résidu est ensuite oxydé pour former un cétoaldéhyde<sup>79</sup> (Schéma 17).

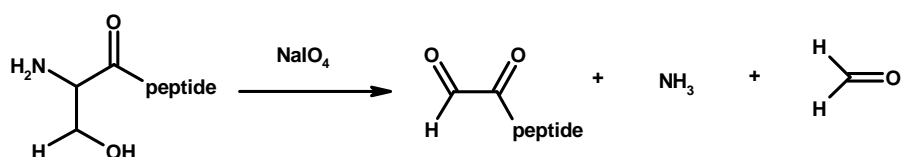


Schéma 17 : Oxydation d'une sérine N-terminale (d'après Geoghegan *et al*<sup>79</sup>)

Du fait de sa simplicité et de son efficacité (oxydation totale en quelques minutes) cette méthode est largement répandue. La thréonine ou la sérine peut être couplée en position N-terminale du peptide ou sur le  $\epsilon\text{-NH}_2$  d'une lysine introduite dans la séquence.

Une fonction 2-aminoalcool a également été introduite sur la chaîne latérale d'un acide-aminé par Hoeg-Jensen et ses collaborateurs<sup>80</sup>. Ceux-ci ont développé à partir de la 5-hydroxyl-lysine (1) la synthèse de la Fmoc-hydroxyl-lysine(Boc-oxazolidine) (2) qui porte sur sa chaîne latérale un 2-aminoalcool protégé sous forme d'oxazolidine (Schéma 18).

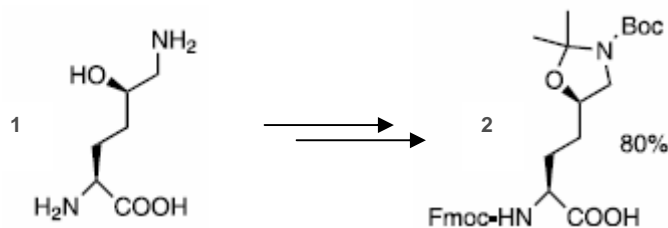


Schéma 18 : Fmoc-hydroxyl-lysine(Boc-oxazolidine) (**2**) (d'après Spetzler *et al*<sup>80</sup>)

L'acide aminé (**2**) peut être introduit dans une séquence peptidique lors de l'élongation. La déprotection du 2-aminoalcool suivie de l'oxydation génère ensuite une fonction méthylaldéhyde, contrairement à l'oxydation de la sérine qui génère un cétoaldéhyde.

L'oxydation d'un 2-diol par  $\text{NaIO}_4$  génère également une fonction aldéhyde. Selon le même principe que précédemment, Hoeg-Jensen et ses collaborateurs avait déjà développé, à partir de l'allylglycine (**3**), la synthèse du composé Fmoc-Adi(Trt) (**4**) où la chaîne latérale possède un 2-diol au lieu d'un 2-amino-alcool (Schéma 19)<sup>81</sup>.

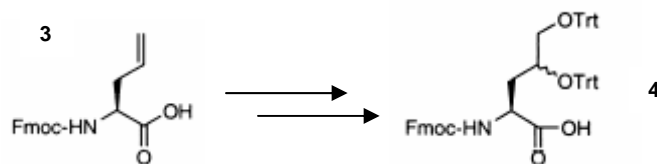


Schéma 19 : Fmoc-Adi(Trt) (**4**) (d'après Spetzler *et al*<sup>81</sup>)

Une méthode intéressante développée par Tam et ses collaborateurs est l'introduction d'un diol en position C-terminale<sup>82</sup>. Le Fmoc-amino-diol (**1**) (Schéma 20) préalablement synthétisé a été couplé sur une résine chlorotriyl puis la fonction alcool libre a été protégée par un *t*-butyl. Ce type de résine, aujourd'hui commercialisée, permet l'élongation du peptide en stratégie Fmoc puis sa déprotection sous forme de diol C-terminal par un traitement TFA. Le diol pourra ensuite être oxydé par  $\text{NaIO}_4$ .

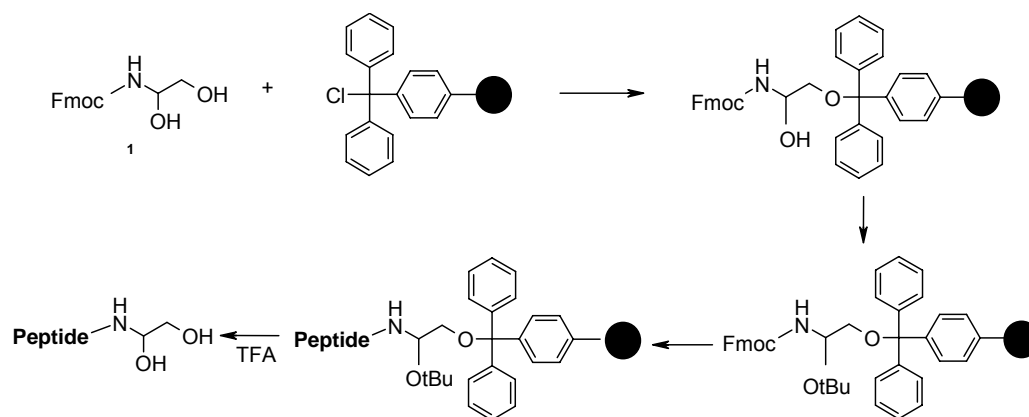


Schéma 20 : Synthèse d'un peptide diol C-terminal (d'après Zhang *et al*<sup>82</sup>)

L'oxydation de 2-amino-alcool ou de 2-diol offre donc de nombreuses possibilités pour l'obtention d'aldéhydes ou de cétoaldéhydes à différentes positions de la chaîne peptidique. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode est la sensibilité de certains acides aminés tels que la méthionine à l'oxydation.

### II. 5. A. b. Dérivés de l'acide diamino-acétique

Afin d'obtenir une fonction cétoaldéhyde en position N-terminale d'un peptide tout en évitant d'avoir à réaliser une étape d'oxydation, Far et Melnyk<sup>32bis</sup> ont développé des dérivés de l'acide diaminoacétique. Ces composés sont en fait des acides glyoxyliques masqués. Dans un de ces dérivés (**1**, Figure 12) les fonctions amines de l'acide diaminoacétique sont protégées par un Fmoc. Le composé **1** peut facilement être couplé par sa fonction acide en position N-terminale d'un peptide ou sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'une lysine. Après le traitement au TFA permettant la coupure du peptide de la résine et la déprotection des chaînes latérales, le cétoaldéhyde est déprotégé en présence d'une base. Un deuxième dérivé où les fonctions amines sont protégées par des groupes 2-(*ter*-butyldisulfanyl)éthoxycarbone a également été préparé (**2**, Figure 12), cette fois le cétoaldéhyde est déprotégé en présence d'une phosphine.

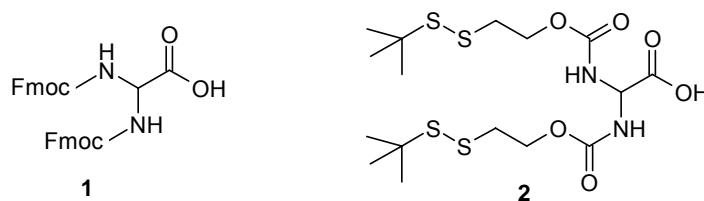


Figure 12 : Dérivés de l'acide  $\alpha,\beta$ -diaminoacétique

## II. 5 . A . c . Utilisation de nouveaux bras espaceurs

De nombreux bras permettant la synthèse d'aldéhyde C-terminaux ont été développés. Selon le bras employé, le peptide est décroché de la résine sous différentes conditions (réduction, ozonolyse...) avec la génération d'une fonction aldéhyde en position C-terminale.

Selon cette méthodologie, Melnyk et ses collaborateurs ont développé un linker basé sur le (+)dimethyl-2-3-*O*-isoprylidene-*D*-tétrate (Schéma 21)<sup>83</sup>. Le groupe protecteur acétonide est stable durant l'élongation du peptide en stratégie Fmoc / *t*Bu. Il est déprotégé en même temps que les chaînes latérales par un traitement TFA pour former un diol qui sera oxydé par le periodate de sodium pour libérer le peptide cétoaldéhyde C-terminal.

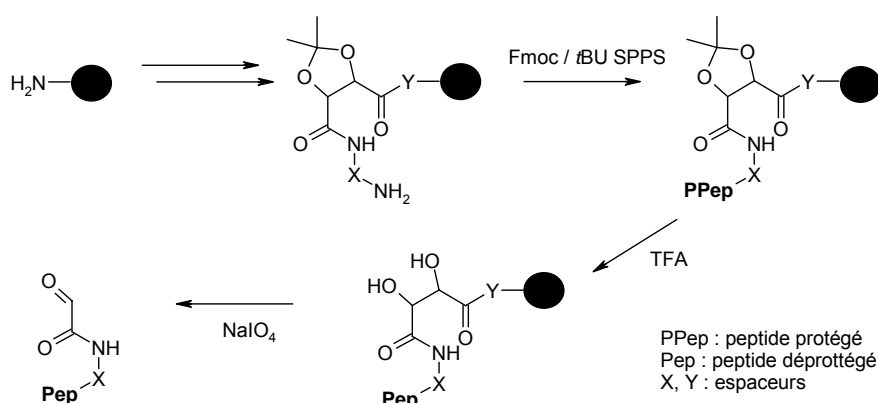


Schéma 21 : Synthèse d'un peptide cétoaldéhyde C-terminal (Melnyk *et al*<sup>83</sup>).

Le bras BAL (Backbone Amide Linker) développé par Barany et ses collaborateurs<sup>84</sup> peut quant à lui être utilisé pour la synthèse d'un peptide portant une fonction aldéhyde, et non pas une fonction cétoaldéhyde, en position C-terminal<sup>85</sup> (Schéma 22). Il s'agit de fixer sur ce bras, par amination réductrice, un amino acétal puis de réaliser l'élongation sur l'amine secondaire. Le traitement TFA final permet de déprotéger l'acétal en même temps que la libération du peptide de la résine. L'inconvénient de cette stratégie est la difficulté de coupler le premier acide aminé sur l'azote secondaire.

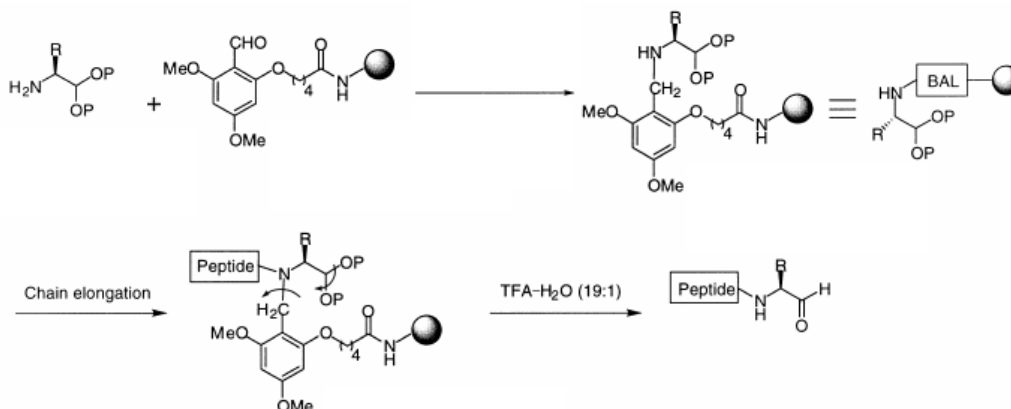


Schéma 22 : Synthèse d'un peptide aldehyde C-terminal à partir du bras BAL (Guillaumie *et al*<sup>85</sup>)



## II.5.A.d. Coupure d'un peptide-résine par déplacement nucléophile

Au laboratoire, Lelièvre et ses collaborateurs ont exploité la sensibilité aux nucléophiles du bras 4-(oxyméthyl)-PhenylAcétamidoMéthyl (« bras PAM » par abus de langage) introduit par Merrifield<sup>86</sup> pour installer en position C-terminale une fonction aldéhyde masquée sous forme d'acétal<sup>87</sup>.

La présence du substituant acétamidométhyl, électroattracteur, en para du phényl rend l'ester benzylique beaucoup plus stable en milieu acide que dans le cas du bras 4-(oxyméthyl)-phenoxy-méthyl de la résine de Wang (Schéma 23). Cette liaison est par contre beaucoup plus sensible aux nucléophiles.

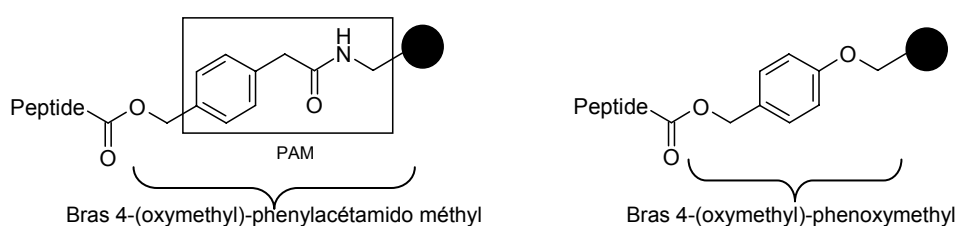


Schéma 23 : Schéma des bras 4-(oxyméthyl)-phenylacétamido méthyl (« bras PAM ») et 4-(oxyméthyl)-phenoxy-méthyl

Selon la stratégie développée par Lelièvre et ses collaborateurs (schéma 24), le bras PAM reste stable durant l'élargissement du peptide en stratégie Fmoc / *t*Bu et la déprotection des chaînes latérales par un traitement TFA. Lors de la réaction d'aminolyse, l'ester benzylique subit un déplacement nucléophile par l'aminocétaldéhyde diméthylacétal pour former un acétal C-terminal. Cet acétal est ensuite très facilement déprotégé par traitement TFA pour obtenir le glycinal C-terminal.

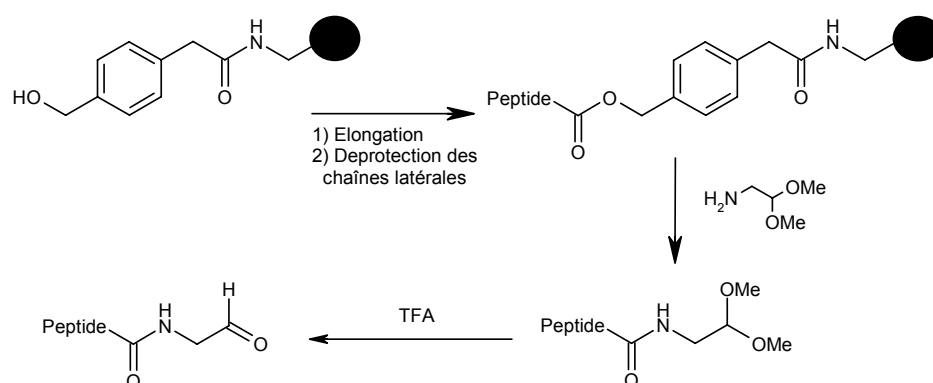


Schéma 24 : Synthèse d'un peptide aldéhyde par aminolyse (d'après Lelièvre *et al*<sup>87</sup>)

Il est important de noter que pour conduire à la synthèse de longs peptides aldehyde par aminolyse il est préférable d'utiliser une résine polaire telle que la résine PEGA<sup>88</sup>. De plus, cette stratégie est réservée pour des peptides possédant une Alanine ou Glycine en position C-terminale. Les rendements de déplacements nucléophiles sont en effet défavorablement influencés par l'encombrement de l'acide aminé C-terminal<sup>89,90</sup>.

### II. 5. A. e. Introduction de groupements cétones

D'autres stratégies visant à introduire des fonctions cétone ont également été développées. Ces stratégies reposent sur le couplage d'acides ou d'acides aminés possédant une fonction cétone.

L'acide 4-oxo-pentanoïque ( $\text{CH}_3\text{-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-COOH}$ )<sup>63</sup> ou l'acide pyruvique ( $\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$ )<sup>66</sup> ont par exemple été couplés sur le  $\epsilon\text{-NH}_2$  de lysines.

Marcaurelle et Bertozzi ont quant à elles développé une méthode de synthèse originale puisqu'elle permet d'introduire sur support solide une cétone en milieu de séquence<sup>91</sup>. Il s'agit de coupler, lors de l'élongation d'un peptide, l'acide aminolévulinique (**3**) obtenu par ozonolyse du résidu commercial 4,5-dehydroleucine (**1**) préalablement protégé par un Fmoc (Schéma 25).

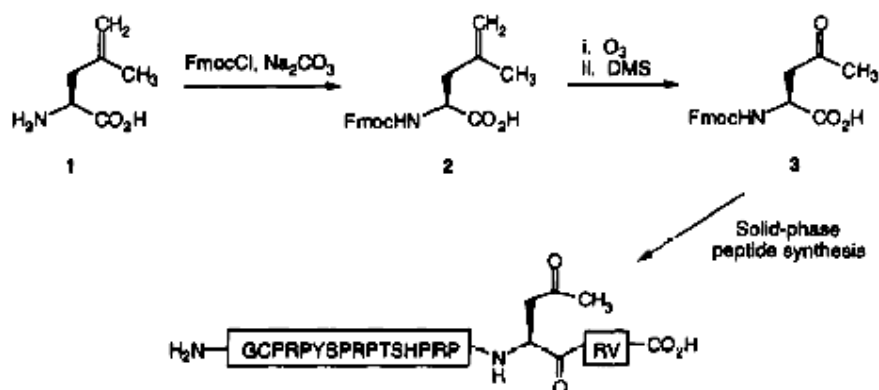


Schéma 25 : Synthèse d'un peptide avec une fonction cétone (Marcaurelle et Bertozzi<sup>91</sup>).

Les différentes stratégies décrites ici permettent d'introduire des fonctions aldéhyde, cétoaldéhyde ou des fonctions cétone en position C- et N-terminale ou en milieu de séquence. De nombreuses possibilités sont donc ainsi offertes pour la synthèse de protéines par ligation chimique oxime ou hydrazone.

## II. 5. B. Synthèse de peptides hydrazide et aminoxy

### II. 5. B. a. « Reverse protéolyse »

La « reverse » protéolyse développée par Rose et ses collaborateurs<sup>92</sup> est une technique qui permet de fonctionnaliser par voie enzymatique l'extrémité C-terminale d'une protéine.

Les protéases sont des enzymes capables d'hydrolyser les protéines de façon régiosélective. Le mécanisme d'hydrolyse fait intervenir un état intermédiaire correspondant au site actif de l'enzyme estérifié par le groupe carboxyle provenant de la liaison hydrolysée. Cet intermédiaire est ensuite hydrolysé par l'eau. Sous certaines conditions ce mécanisme peut fonctionner en sens inverse. Dans ce cas, un nucléophile est utilisé en très gros excès pour déplacer la liaison ester de l'état intermédiaire (Schéma 26).

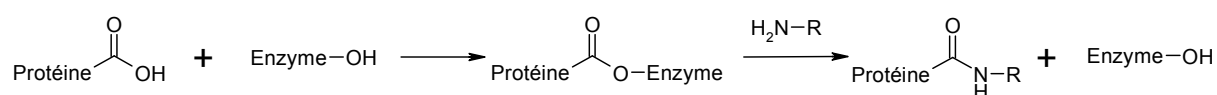


Schéma 26 : Fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale des protéines par « reverse protéolyse »

Plusieurs types d'hydrazide ont ainsi été introduits en position C-terminale de peptides ou de protéines : carbohydrazide (-NHNH-CO-NHNH<sub>2</sub>)<sup>51, 92</sup>, hydrazide (-NHNH<sub>2</sub>)<sup>92</sup>, adipohydrazide (-NHNH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-NHNH<sub>2</sub>)<sup>92</sup>.

### II. 5. B. b. Acylation de l'extrémité N-terminale

Le couplage des dérivés de l'acide aminoxyacétique (Aoa) sur l'extrémité N-terminale d'un peptide-résine est fréquemment utilisé pour l'introduction d'une fonction aminoxy. Lors des premiers essais de ligation avec une liaison oxime, Rose et ses collaborateurs ont utilisé l'ester de succinimide protégé sur le N<sup>α</sup>, Boc-Aoa-OSu (**1**)<sup>52</sup> (Schéma 27).

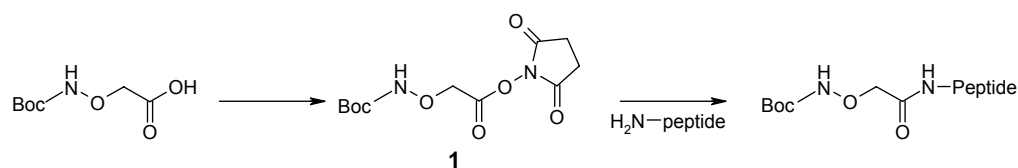
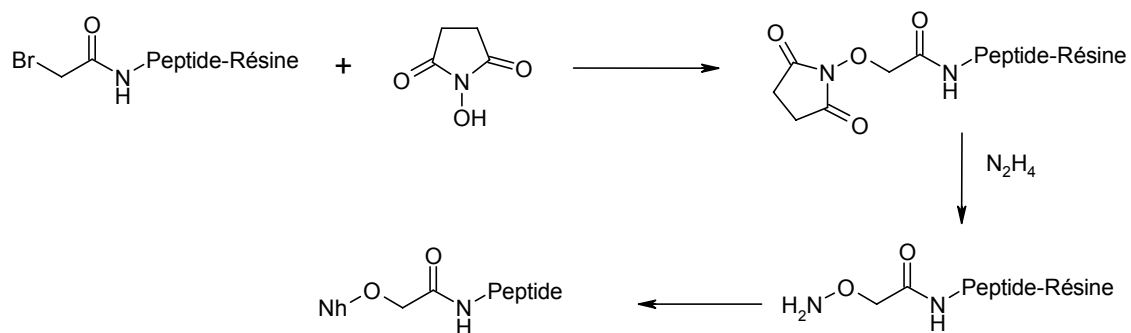


Schéma 27 : Couplage de l'acide aminoxy acétique en position N-terminale d'un peptide (d'après Rose *et al*<sup>52</sup>).

Afin d'obtenir une fonction aminoxy en position C-terminale, Canne et ses collaborateurs ont couplé l'acide Boc-Aoa-OH sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'une lysine C-terminale<sup>63</sup>.

Le couplage de l'acide Boc-Aoa-OH peut cependant être accompagné d'un risque d'« overacylation » du fait de la nucléophilie de l'azote en  $\alpha$  de l'oxygène et de l'augmentation du caractère acide du proton porté par celui-ci. Pour éviter ce problème, Jensen et ses collaborateurs ont préparé le dérivé diprotégé Boc<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-COOH<sup>93</sup>.

Outre l'utilisation des dérivés de l'Aoa, il est possible d'obtenir une fonction aminoxy en position N-terminale d'un peptide en utilisant le N-hydroxysuccinimide pour le déplacement nucléophile d'un peptide-résine N-bromoacétamide. L'élimination du groupement succinimide par l'hydrazine génère ensuite la fonction aminoxy (Schéma 28)<sup>94</sup>.



**Schéma 28** : Utilisation de l'hydroxysuccinimide pour la synthèse d'un peptide aminoxy (d'après Horn *et al*<sup>94</sup>)

Afin d'obtenir une fonction hydrazine en position N-terminale, Melnyk et ses collaborateurs ont testé, selon le même principe que le couplage des dérivés de l'Aoa, le couplage de dérivés de l'acide  $\alpha$ -hydrazino acétique<sup>95</sup>. D'après cette étude, l'utilisation de l'acide monoprotégé sur le  $\beta$ -NH<sub>2</sub> (**1**) (Schéma 29) représente, de même que pour le couplage du Boc-Aoa-OH, un risque de polymérisation de l'acide  $\alpha$ -hydrazinoacétique. Le couplage de l'acide entièrement protégé (**2**) permet d'éviter cette réaction secondaire. Ce dérivé est maintenant commercialisé.



**Schéma 29** : Acide  $\alpha$ -hydrazinoacétique mono (**1**) et tri-protégé (**2**) (Bonnet *et al*<sup>95</sup>)

Il est important de noter que, contrairement à la « reverse protéolyse », le couplage des dérivés de l'acide  $\alpha$ -hydrazino acétique permet d'introduire une fonction hydrazine et non hydrazide. D'autres méthodes plus anecdotiques ont été utilisées pour l'introduction de fonctions hydrazide ou hydrazine telles que l'amination par le BCPO (N-Boc-3-(4-cyanophenyl)oxazolidine)<sup>96</sup> ou le déplacement nucléophile d'un ester par l'hydrazine en solution<sup>51</sup> et sur résine<sup>97</sup>.

### II. 5. B. c. Synthèse d'acides aminés aminooxy

De même que pour la synthèse de peptide cétone ou aldéhyde, des dérivés d'acides aminés portant une fonction aminooxy ont été synthétisés afin de pouvoir être utilisés lors de l'élongation de peptide en SPPS. Mutter et ses collaborateurs ont par exemple synthétisé des dérivés de la L-Homocaniline protégée par un Boc ou un Alloc à partir de l'acide glutamique (Schéma 30)<sup>98</sup>.

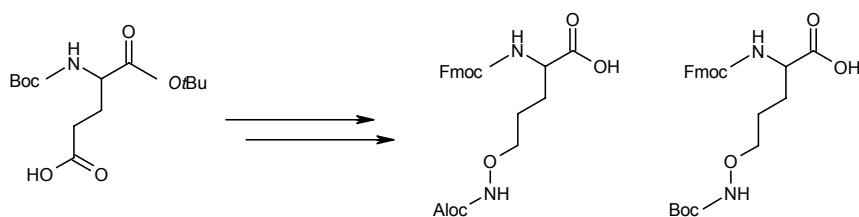


Schéma 30 : Dérivés de la L-Homocaniline issus de l'acide glutamique (d'après Lang *et al*<sup>98</sup>)

Hoeg-Jensen et ses collaborateurs ont synthétisé un autre type de dérivés, la Fmoc-Ams(Boc)-OH (Ams = Aminosérine) à partir de la cyclosérine (Schéma 31)<sup>99</sup>. Ce dérivé est désormais commercialisé.

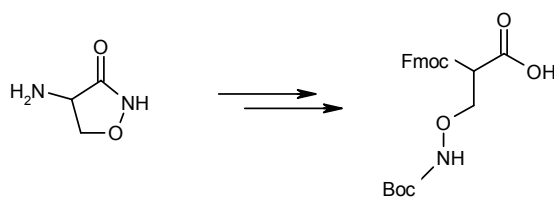


Schéma 31 : Fmoc-Ams(Boc) dérivé de la cyclosérine (d'après Sptezler *et al*<sup>99</sup>)

## **II. 6 . Conclusion**

Dans cette partie nous avons montré le potentiel qu'offre la ligation chimique pour la synthèse de protéines. Nous avons en particulier montré l'intérêt des liaisons oxime et hydrazone ainsi que la possibilité d'utiliser la liaison oxime pour la synthèse de MAP s'avérant être de bon immunogènes.

Les multiples possibilités mises à la disposition des chimistes pour la synthèse de peptides portant des fonctions aldéhyde, cétone, hydrazide, hydrazine ou aminoxy devraient nous permettent de mettre au point une méthode de synthèse modulaire d'un vaccin synthétique anti-tumoral possédant plusieurs copies de la séquence Muc1 présentées de façon branchée ainsi qu'un épitope T auxiliaire.

Afin d'augmenter la spécificité de notre vaccin, l'introduction de groupement saccharidique semble importante. Nous allons donc nous intéresser dans le chapitre qui suit à la synthèse de glycopeptides et glycoprotéines.

## III . Synthèse de glycopeptides

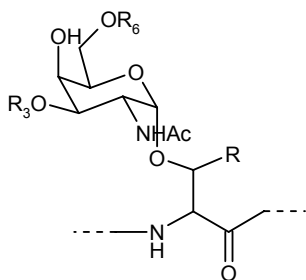
### III . 1 . Introduction

La majorité des protéines naturelles portent des chaînes saccharidiques et sont en fait des glycoprotéines. Les résidus saccharidiques sont liés de façon covalente sur les chaînes latérales des acides aminés, soit sur l'azote (*N*-glycosylation) de l'asparagine soit sur l'oxygène (*O*-glycosylation) des sérines et thréonines et également de l'hydroxylysine présente dans le collagène de type II<sup>100</sup>.

Les glycoprotéines jouent un rôle important dans les processus biologiques<sup>100bis</sup>. En plus de leur influence sur la conformation et les propriétés physico-chimiques des protéines, les groupements saccharidiques sont impliqués dans les phénomènes de reconnaissance et de communication cellulaire ainsi que dans le système immunitaire.

Afin de pouvoir réaliser des études structurales ou fonctionnelles, il est nécessaire de synthétiser ces glycopeptides ou glycoprotéines avec une structure définie et homogène et en quantité suffisante. Ceci s'étant avéré être difficile par voie biologique, de nouvelles méthodes chimiques ou chimioenzymatiques ont été développées dans cet objectif. Cette partie consiste donc à faire le point sur ces différentes approches.

Dans le cadre de la synthèse d'un vaccin anticancéreux, nous nous intéresserons plus particulièrement à la *O*-glycosylation de type mucine. Rappelons que dans ce cas, le premier monomère saccharidique fixé sur les thréonines ou les sérines est l' $\alpha$ -D-galactosamine *N*-acétylée. Les saccharides suivants sont fixés en position 3 et/ou 6 pour former des sucres plus complexes (Figure 12).



Noyaux	R3	R6
1	$\beta$ -Gal	H
3	$\beta$ -GlcNAc	H
5	$\alpha$ -GalNAc	H
6	H	$\beta$ -GlcNAc
7	H	$\alpha$ -GalNAc
2	$\beta$ -Gal	$\beta$ -GlcNAc
4	$\beta$ -GlcNAc	$\beta$ -GlcNAc

Figure 12 : *O*-glycosylation de type Mucine. (dans Marcaurelle et Bertozzi<sup>101</sup>)

## III . 2 . Les différentes méthodes de synthèse de glycopeptides

A partir des années 1980, de nombreux progrès ont été réalisés pour la synthèse de glycopeptides et différentes stratégies ont pu être développées<sup>102</sup>.

De façon générale, à partir des monomères peptidiques ou saccharidiques, la synthèse de glycopeptides comporte trois étapes pouvant être réalisées dans des ordres différents (Figure 13) :

- la formation du squelette peptidique (A)
- la formation des liaisons *O*-Glycosidiques entre les monomères sacchariques (B)
- la formation de la liaison *O*-glycosidique entre le peptide et l'oligo-/mono-saccharide (C).

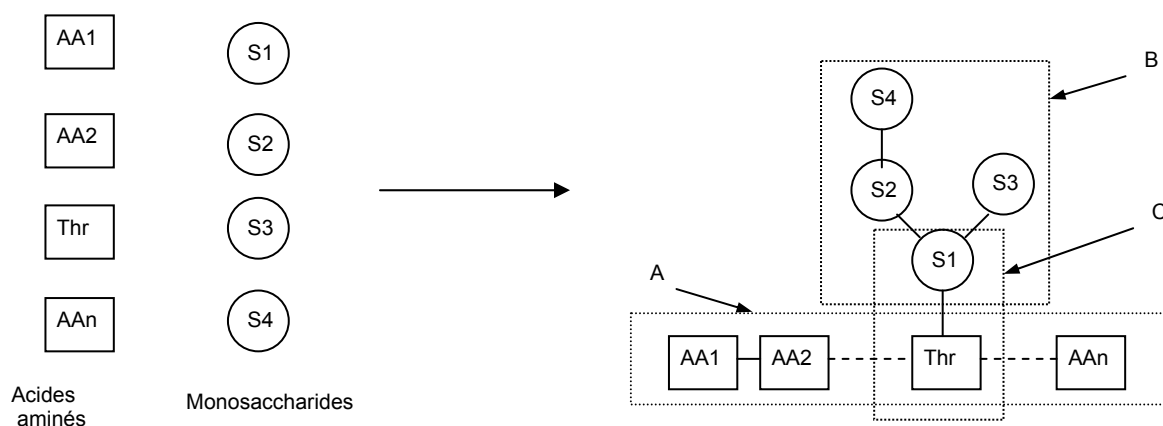


Figure 13 : Synthèse de glycopeptides

La stratégie visant à glycosyler par voie chimique un peptide déjà formé a été très peu utilisée. La difficulté de celle-ci est l'obtention d'une liaison *O*-glycosidique stéréosélective entre le peptide et le groupement saccharidique. La glycosylation stéréosélective est en effet difficile à réussir avec des donneurs ou des accepteurs de glycosyles complexes. L'approche des synthons glycosylés consistant à synthétiser un acide aminé glycosylé qui est ensuite introduit dans la chaîne peptidique lors de l'élongation du peptide est donc la plus utilisée (Figure 14 A).

Contrairement à la glycosylation par voie chimique, la glycosylation enzymatique permet de glycosyler un peptide déjà formé sans problème de stéréosélectivité. Ceci constitue donc une deuxième approche qui a également été exploitée à de nombreuses reprises (Figure 14 B).



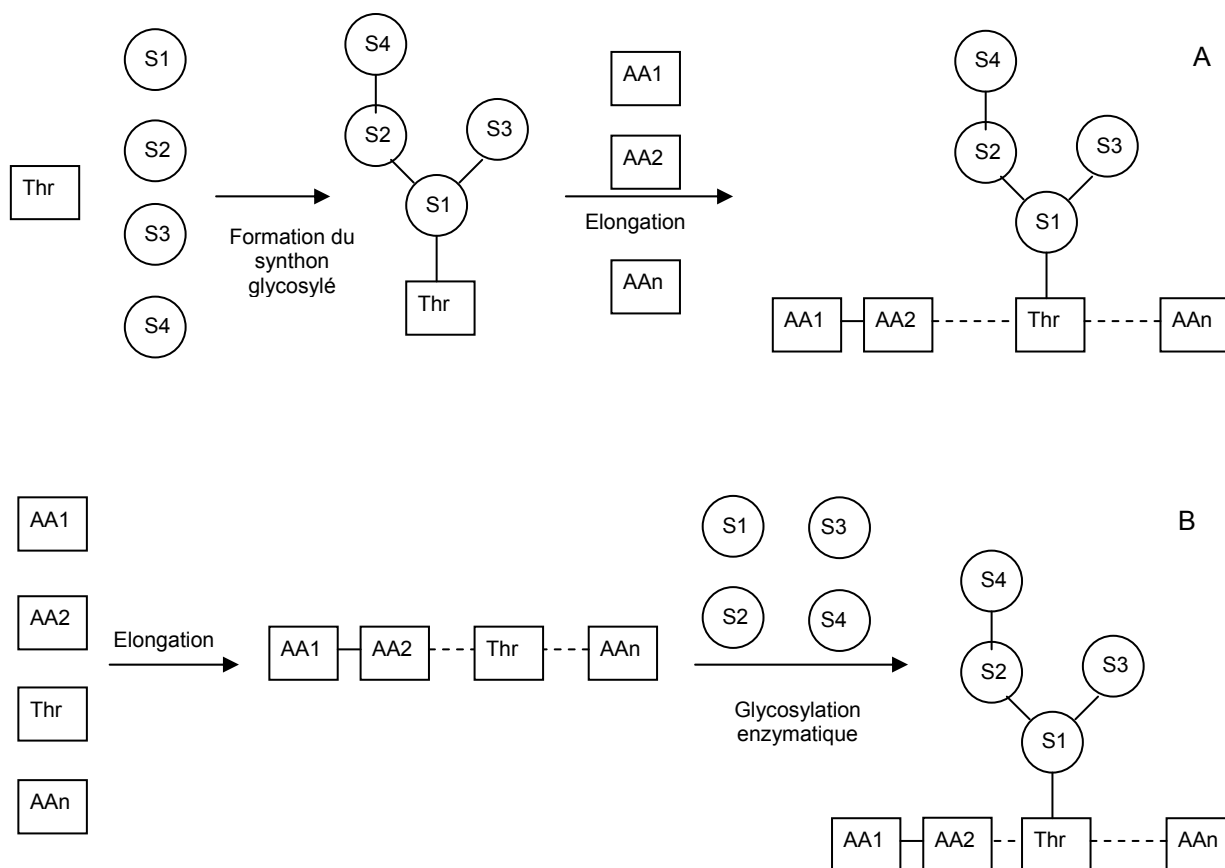


Figure 14 : Synthèse de glycopeptide selon l'approche du synthon glycosylé (A) et de la glycosylation enzymatique (B)

Plus récemment la ligation chimique développée pour la synthèse de peptides et de protéines, dont nous avons discuté l'intérêt au cours du chapitre précédent, a également été utilisée pour la synthèse de glycopeptides que se soit pour réaliser la liaison entre le peptide et l'oligosaccharide, entre les monomères saccharidiques ou entre deux glycopeptides synthétisés par les méthodes précédentes. Ces trois approches vont être étudiées dans les trois paragraphes suivants.

### III. 3. Synthèse de glycopeptides selon l'approche des synthons glycosylés

L'étape délicate pour la synthèse de glycopeptide selon cette approche est la préparation du synthon glycosylé. De nombreuses méthodes de préparation de ces synthons glycosylés ont été développées<sup>103</sup>. Dans le cas de glycopeptides ou glycoprotéines de type mucine, le premier monomère saccharidique fixé sur les thréonines ou les sérines est l' $\alpha$ -D-galactosamine *N*-acétylée ( $\alpha$ -GalNAc), ceci constitue l'antigène Tn. Le synthon le plus simple nécessaire à la synthèse de tels glycopeptides est donc le synthon Ser/Thr- $\alpha$ -GalNAc,  $N^\alpha$  protégé.

#### III. 3. A. Synthèse de glycopeptides portant l'antigène Tn

La méthode couramment utilisée pour la formation de la liaison  $\alpha$ -*O*-glycosidique du synthon Ser/Thr- $\alpha$ -GalNAc est celle développée par Paulsen et ses collaborateurs<sup>104</sup>. Ceux-ci ont introduit l'utilisation de donneurs de glycosyles, tels que les chlorures de glycosyles, possédant une fonction azido ( $N_3$ ) non participante en position 2, permettant la formation majoritaire de la liaison  $\alpha$ . Cette méthode est d'autant plus intéressante que ce composé est facilement accessible par la réaction d'azidonitration mise au point par Lemieux et ses collaborateurs<sup>105</sup>. Cette méthode a été appliquée pour la première fois par Ferrari et Pavia pour la glycosylation d'une thréonine et d'une sérine portant les groupes protecteurs Z et Bzl sur leur fonction amine et acide<sup>106</sup> (Schéma 32).

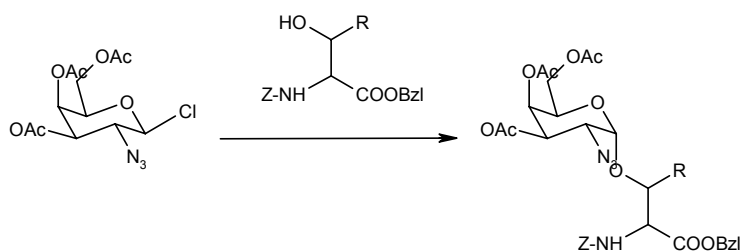


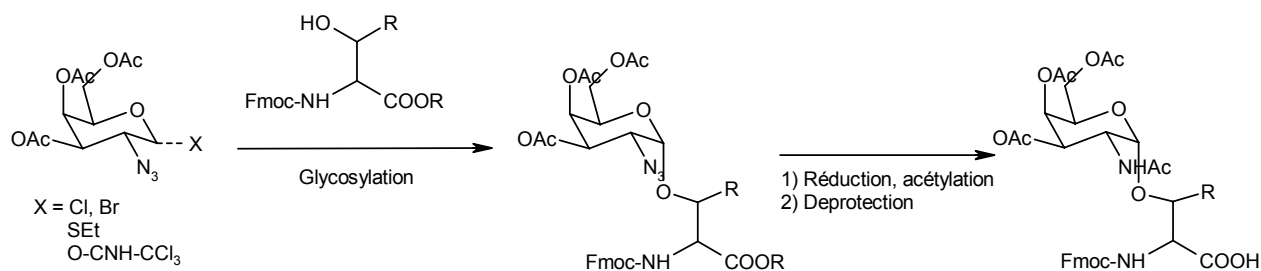
Schéma 32: Glycosylation de sérine et thréonine par un chlorure de 2-azidoglycosyle (Ferrari et Pavia<sup>106</sup>)

La fonction acétamido (AcNH) est ensuite obtenue par réduction puis acétylation de la fonction azido du glycoconjugué.

Kunz et ses collaborateurs sont parmi les premiers à avoir utilisé de tels synthons pour l'élaboration de glycopeptides. Un tripeptide Ac-Ser-Ser( $\alpha$ -GalNAc)-Ser( $\alpha$ -GalNAc)-OH a ainsi été préparé en solution<sup>107</sup>.

Vu son efficacité en solution, la stratégie visant à utiliser des synthons Thr/Ser- $\alpha$ -GalNAc pour la synthèse de glycopeptides a ensuite été appliquée en phase solide dont les avantages pour la synthèse de peptides sont bien connus. La stratégie utilisée est la stratégie Fmoc/*t*Bu, plus compatible avec la présence de la liaison *O*-glycosidique, sensible en milieu acide, que la stratégie Boc/Bzl. Durant l'élongation, les fonctions alcools du glycosyle sont protégées sous forme d'ester par des fonctions acétyles.

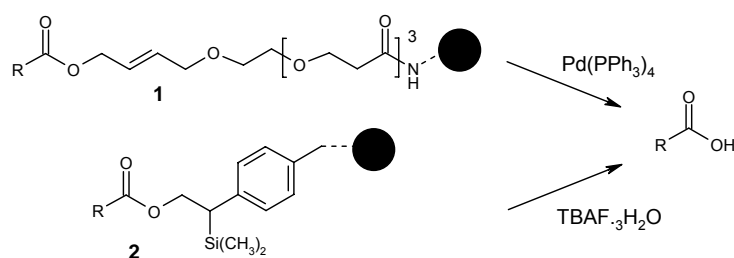
Le synthon Fmoc-Thr/Ser( $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>GalNAc)-OH est préparé selon le même principe que précédemment (Schéma 33). Il est aujourd'hui commercialisé mais à des prix prohibitifs.



**Schéma 33** : Préparation du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc-OH) (dans Marcaurelle et Bertozzi<sup>101</sup>)

En plus des linkers classiques Rink et Wang, permettant de couper le glycopeptide de la résine en même tant que la déprotection des chaînes latérales par un traitement TFA, Kunz et ses collaborateurs ont développé deux autres types de linker pour la synthèse de glycopeptides (Schéma 34) :

- le linker allylic HYCRON<sup>31a</sup> (**1**), coupé par transfert d'allyl catalysé par Pd(0)
- le linker PTMSLE<sup>108</sup> ((2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-linker) (**2**) labile en présence d'ion fluorure



**Schéma 34** : Linker Hycron (**1**) et PTMSLE (**2**) (d'après Seitz et Kunz<sup>31a</sup>, Wagner *et al*<sup>108</sup>)

Le linker HYCRON a été utilisé pour la synthèse d'un nonapeptide APDTRPAPGSTA correspondant à une fraction de l'unité de répétition de MUC1 glycosylée sur la thréonine du déterminant DTR<sup>31a</sup> (Schéma 35). Lors de l'élongation, le dérivé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH est introduit selon les procédures standard de couplage. Après l'élongation, le peptide est séparé de la résine par un traitement Pd(0), les chaînes latérales sont déprotégées par un traitement TFA et les fonctions acétyles, permettant la stabilité de la liaison *O*-glycosidique pendant le traitement TFA, sont éliminées par un traitement au méthanolate de sodium.

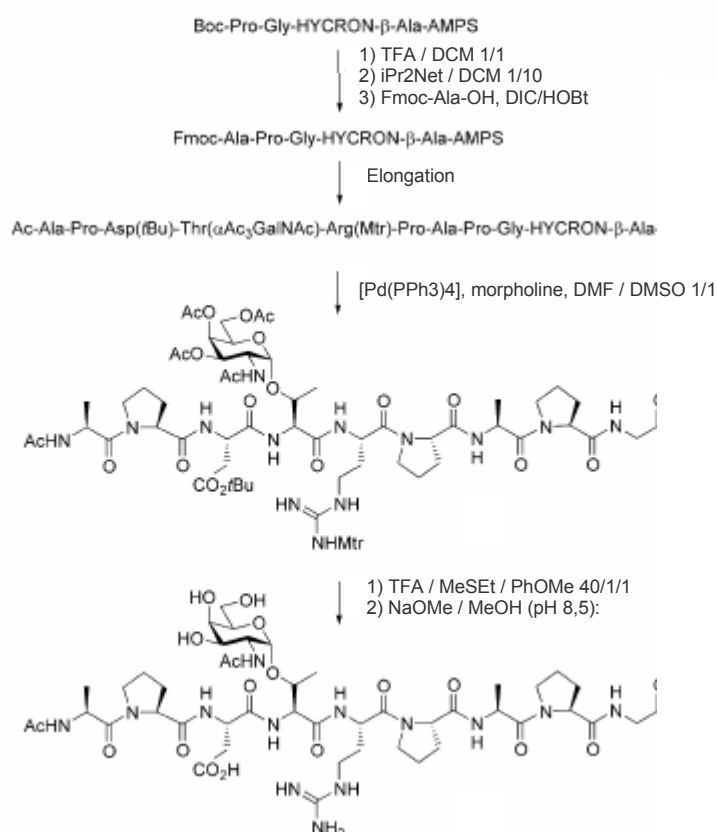


Schéma 35: Synthèse sur support solide du peptide Ac-APDT( $\alpha$ -GalNAc)RPAPGSTA (dans Broke et kunz<sup>30a</sup>)

### III.3.B. Synthèse de glycopeptides portant des groupements saccharidiques complexes

Contrairement à la synthèse de synthons portant un simple résidu  $\alpha$ -GalNAc la préparation de synthons portant une partie saccharidique plus complexe s'avère être beaucoup plus délicate et fait appel au savoir-faire de la glycochimie. Celle-ci peut être réalisée soit en glycosylant directement l'acide aminé avec l'oligosaccharide (stratégie A) soit en glycosylant l'acide aminé avec le monomère GalNAc qui sera ensuite lui-même glycosylé avec les autres monomères (Stratégie B) (Figure 15).

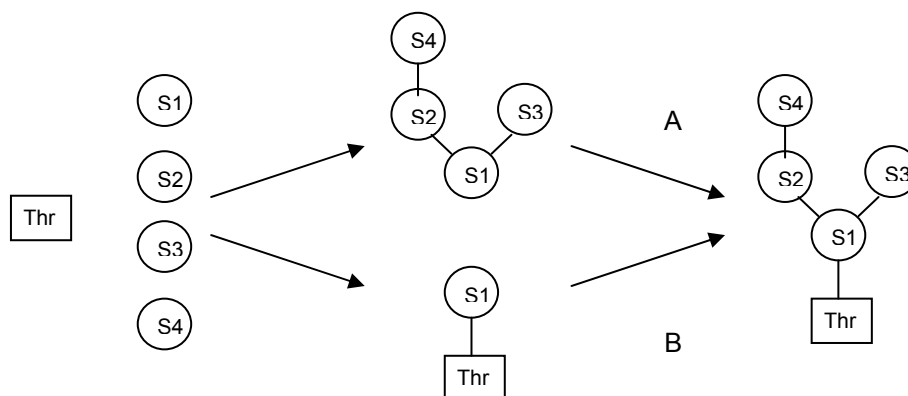


Figure 15 : Préparation de synthon Thr-Oligosaccharide

Afin d'assurer la stéréosélectivité de la liaison *O*-glycosidique entre la thréonine et l'oligosaccharide, il est préférable d'effectuer cette réaction de glycosylation avec un donneur de glycosyle simple. La voie B est donc la plus adaptée. Lors de la glycosylation de la thréonine par le monomère saccharidique, ce dernier doit porter des groupes protecteurs orthogonaux sur les différentes fonctions alcool afin de pouvoir ensuite être glycosylé régiosélectivement sur les alcools en position 3 et 6 (Figure 16).

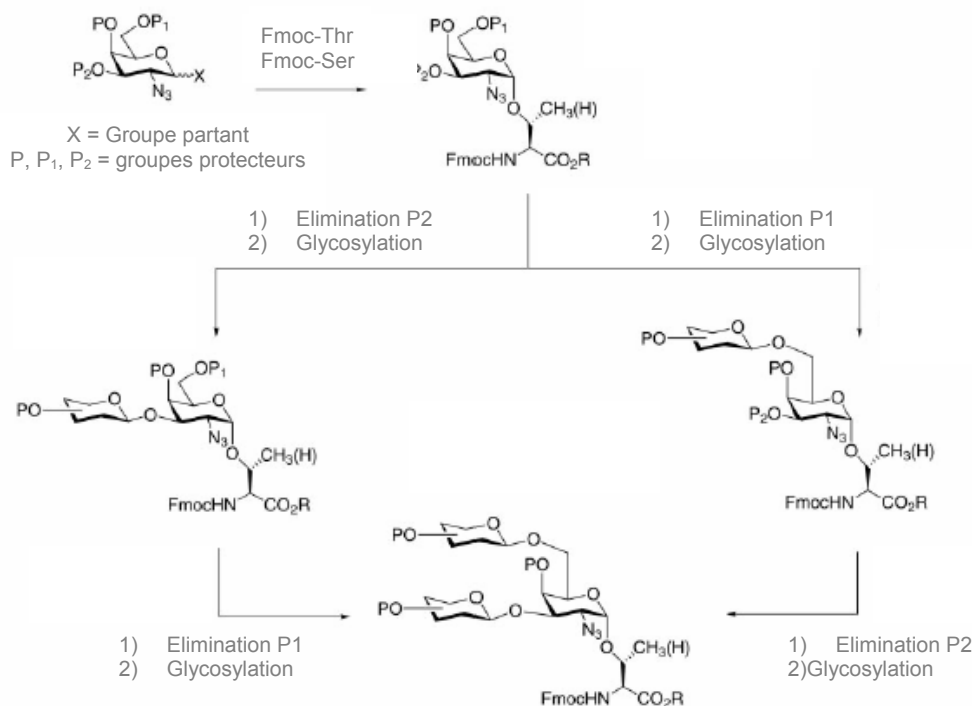


Figure 16 : Stratégie de synthèse de synthons glycosylés avec des oligosaccharides (dans Marcaurelle et Bertozzi<sup>101</sup>)

Meldal et ses collaborateurs ont fortement contribué au développement de cette méthode<sup>109</sup>. A partir du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu et de deux donneurs de glycosyles, ils ont pu synthétiser les synthons glycosylés correspondant aux noyaux 1, 2, 3, 4 et 6 des mucines. Les deux donneurs de glycosyle (Schéma 36) sont le glucose possédant en position 2 une amine protégée par un [(trichloroéthyl)-oxy]-carbonyle et dont les fonctions alcool sont protégées par des benzoyles (**1**) et le galactose dont les fonctions alcool sont protégées par des acétyles (**2**). Les groupes protecteurs en position 2 jouent ici le rôle de groupe participant, la liaison formée avec un accepteur de glycosyle est donc de géométrie  $\beta$  (Schéma 37). Après la glycosylation, la fonction acétamide est générée par réduction et acétylation.

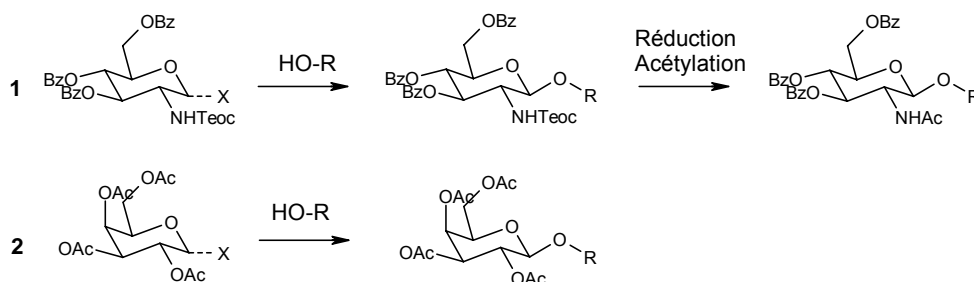
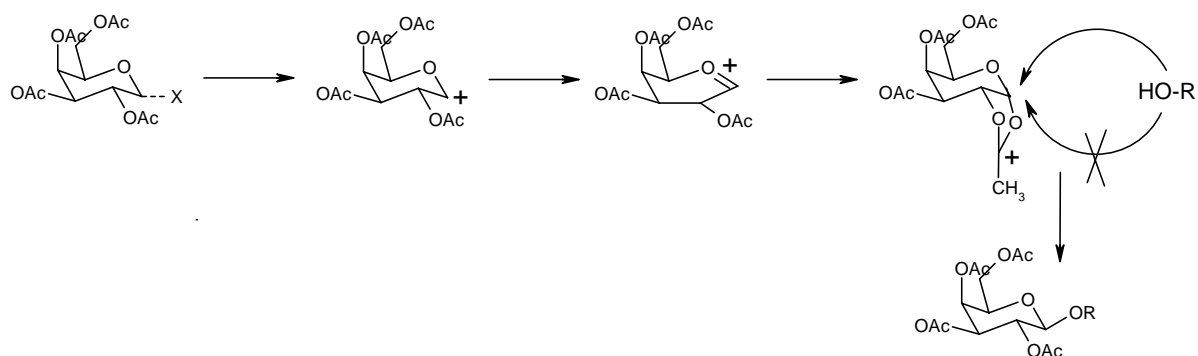
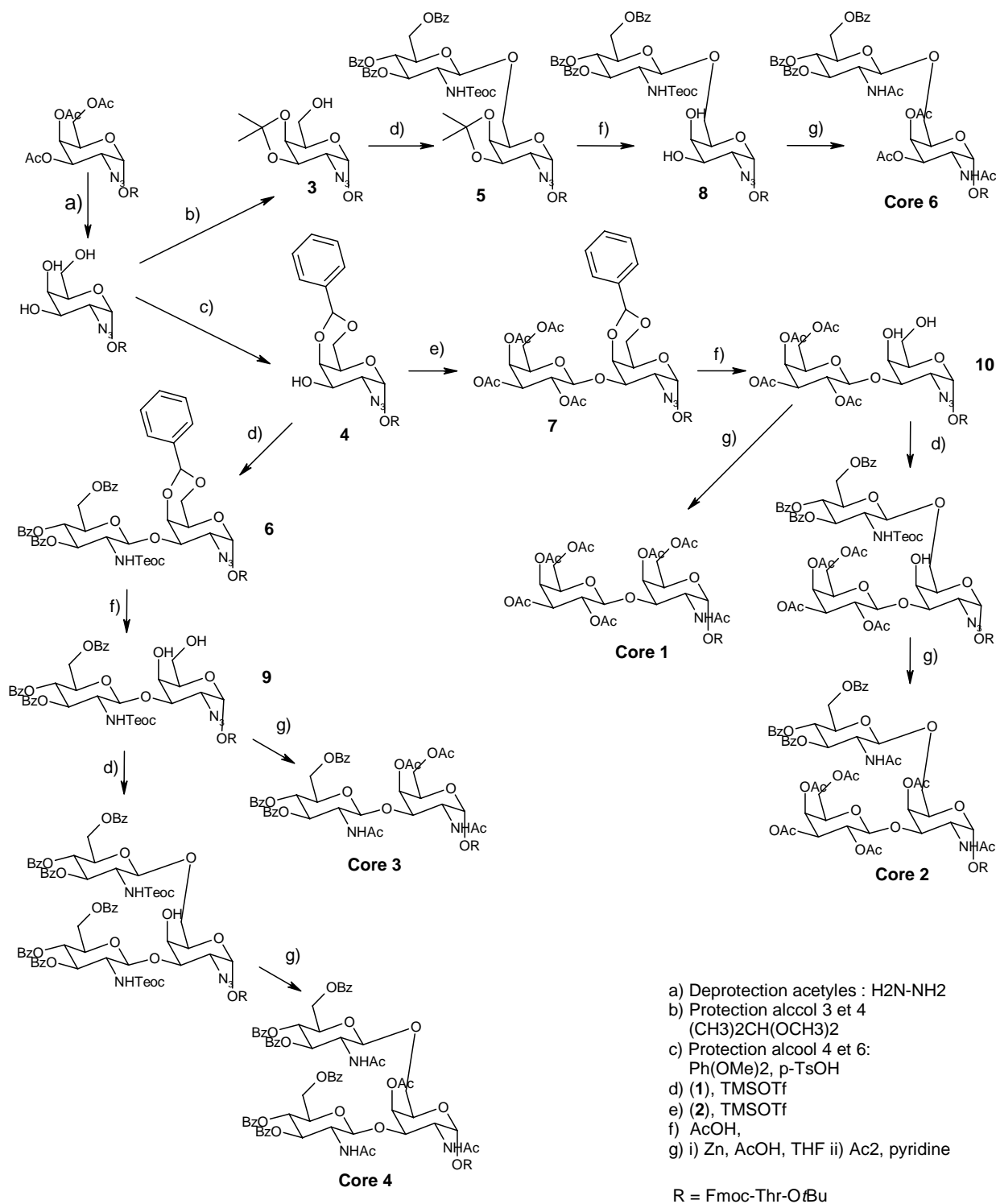


Schéma 36 : Donneurs de glycosyle utilisés pour la synthèse des Noyaux 1, 2, 3, 4 et 6 (d'après Meinjohanns *et al*<sup>109a</sup>, Matthieux *et al*<sup>109b</sup>)



**Schéma 37** : Utilisation d'un groupe participant pour la formation stéréosélective d'une liaison  $\beta$

La synthèse des noyaux 1, 2, 3, 4 et 6 (Schéma 38) consiste à déprotéger les fonctions alcool du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu et à protéger les fonctions 3 et 4 (composé **(3)**) ou 4 et 6 (composé **(4)**) afin de glycosyler sélectivement la fonction 6 avec le donneur de glycosyle 1 (composé **(5)**) ou la fonction 3 avec le donneur de glycosyle **(1)** (composé **(6)**) ou **(2)** (composé **(7)**). Les composés **(8)**, **(9)** et **(10)** obtenus après déprotection des fonctions alcool sont réduits et acétylés pour former les noyaux 6, 3 et 1. Les composés **(9)** et **(10)** peuvent aussi subir une deuxième glycosylation sur la fonction 6 pour donner après acétylation et réduction, les noyaux 4 et 2. Les synthons ainsi obtenus ont été utilisés avec succès pour la synthèse d'une série de décapeptides correspondant aux unités de répétition de MUC2 et MUC3.



**Schéma 38 :** Préparation des synthons pour la synthèse de glycopeptides MUC2 et MUC3 portant les noyaux 1, 2, 3, 4 et 6 (d'après Meinjohanns *et al*<sup>109a</sup>, Matthieux *et al*<sup>109b</sup>)

Danishefsky et ses collaborateurs<sup>110</sup> ont ensuite appliqué cette stratégie pour la préparation de synthons possédant une partie saccharidique beaucoup plus complexe (Schéma 39).



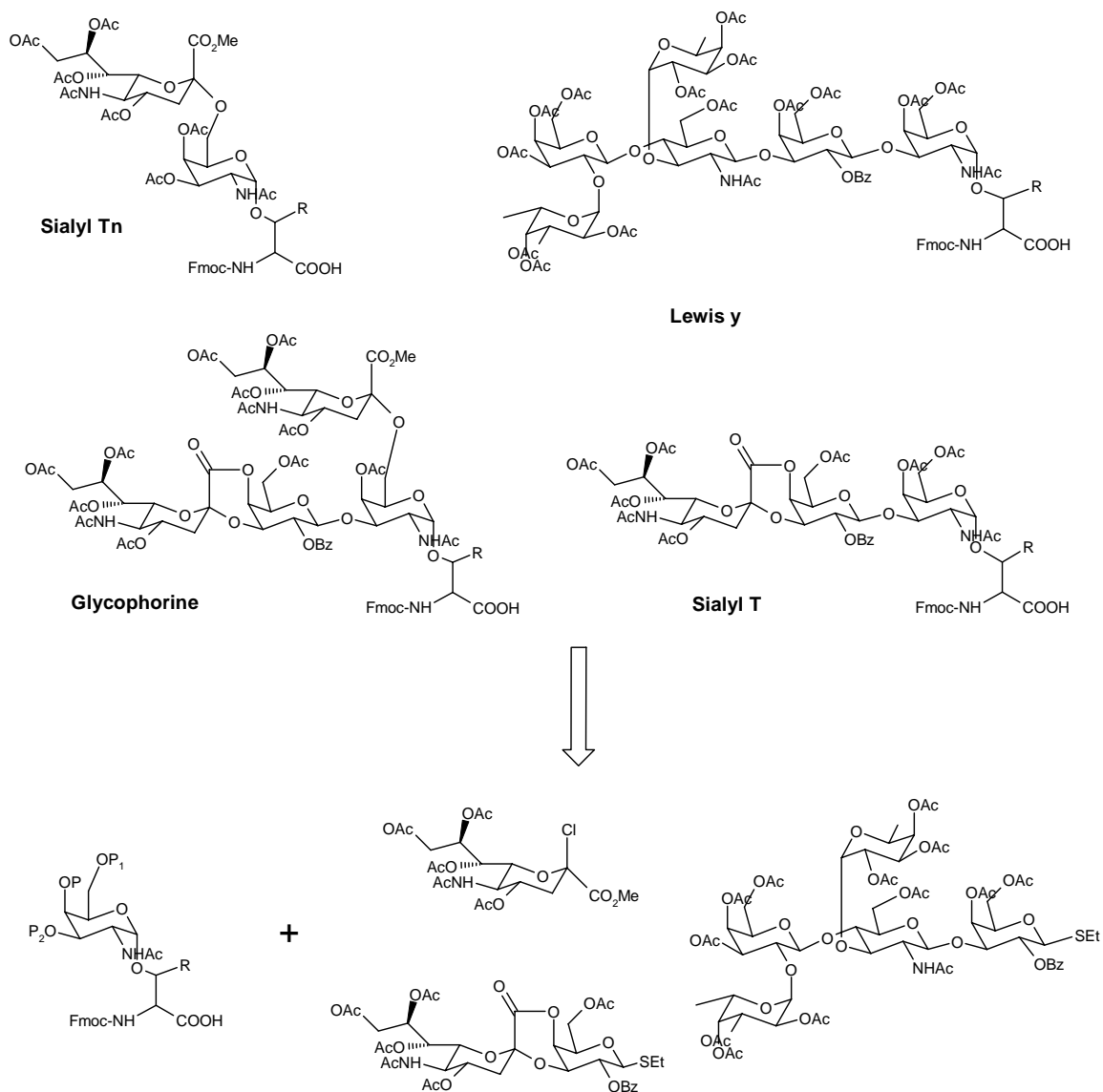


Schéma 39 : Synthons glycosylés préparés par Danishefsky et ses collaborateurs (d'après Schwartz *et al*<sup>110</sup>)

### III. 4. Glycosylation enzymatique

Les difficultés rencontrées pour la synthèse de glycopeptides sont d'une part la stéréosélectivité des liaisons glycosidiques formées et d'autre part la polyfonctionnalité des groupements saccharidiques qui nécessite l'emploi d'une large gamme de groupes protecteurs. Bien que, comme nous venons de le voir, de nombreux progrès ont été faits dans ce domaine, la synthèse de tels glycopeptides à une échelle supérieure à 1 mmole reste difficile, l'étape limitante étant la préparation du synthon glycosylé. L'approche enzymatique consistant à glycosyler par réaction enzymatique un peptide déjà formé est une alternative qui permet de s'affranchir de ces difficultés<sup>111</sup>.

#### III. 4. A. Les différentes enzymes utilisées pour la glycosylation

Il existe deux types d'enzymes pouvant être utilisées pour la synthèse de glycopeptides : les glycosidases et les glycosyltransférases.

*In vivo*, les glycosidases hydrolysent les liaisons glycosidiques. Sous certaines conditions, elles peuvent être utilisées pour catalyser la formation d'une liaison glycosidique. Il suffit d'introduire dans le milieu un accepteur de glycosyle nucléophile pour qu'il vienne piéger l'espèce intermédiaire avant que celle-ci ne soit hydrolysée par l'eau. Les donneurs de glycosyle pour une telle transglycosylation sont des di- ou oligo-saccharides, des aryles de glycoside ou des fluorures de glycoside (Schéma 40).

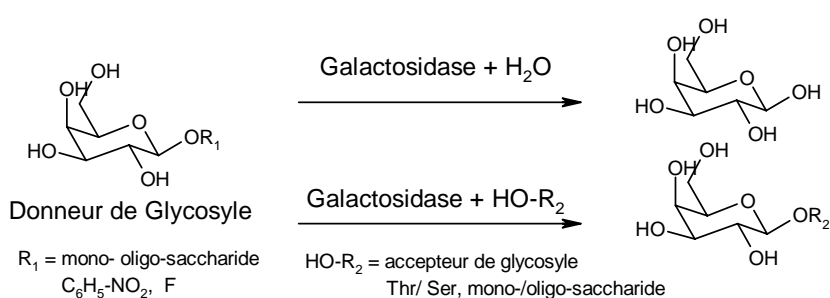


Schéma 40 : Synthèse d'une liaison O-glycosidique avec le galactose par une galactosidase (d'après Gilson *et al*<sup>111</sup>)

Les glycosyltransférases sont utilisées *in vivo* pour la biosynthèse des oligosaccharides. Il existe deux types de glycosyltransférases : les glycosyltransférases de type Leloir utilisent comme substrats donneurs de glycosyle des monosaccharides

préalablement activés sous forme d'ester de nucléoside mono- ou di-phosphate, les autres utilisent des glycosyles phosphates.

### III . 4 . B . Les glycosyltransférases de type Leloir

Les glycosyltransférases de type Leloir sont responsables de la biosynthèse de la plupart des *N*- et *O*-glycoprotéines chez les mammifères. Du fait de leur haute sélectivité en terme de régio- et stéréo-chimie, leur utilisation en synthèse chimique est prometteuse.

*In vivo*, la première étape de la glycosylation enzymatique commence par l'activation des monosaccharides sous forme de nucléoside mono-ou diphosphate (Figure 17) qui sont les substrats donneurs de glycosyle utilisés par les glycosyltransférases.

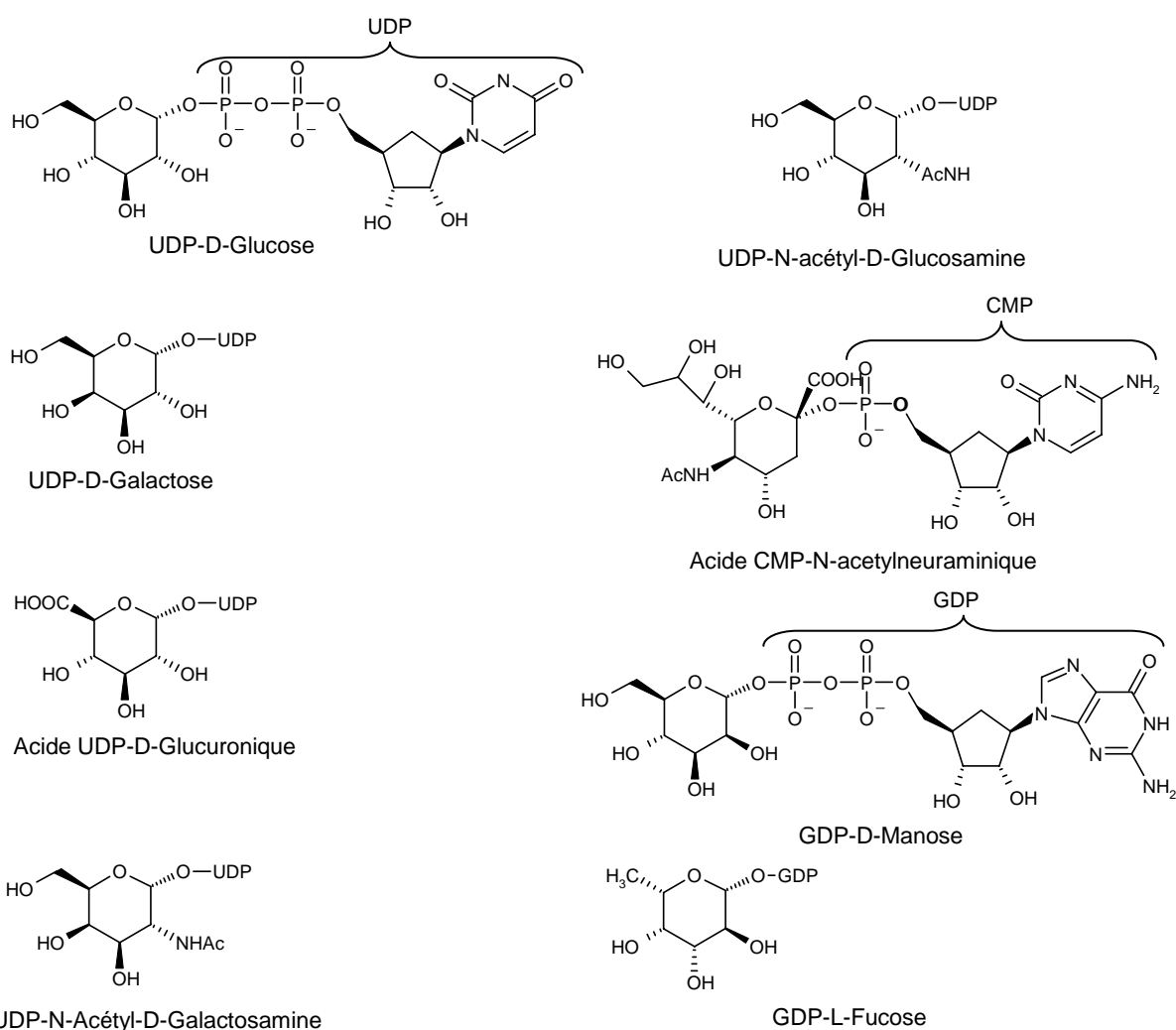


Figure 17 : Donneurs de glycosyle utilisés pour la biosynthèse des oligosaccharides et glycoprotéines

Lors de la réaction de glycosylation, le glycosyle est transféré du substrat donneur au substrat accepteur avec la libération du nucléoside phosphate (Schéma 41). Les huit substrats précédemment décrits peuvent être utilisés par plusieurs enzymes. Les glycosyltransférases ont chacune leur spécificité vis à vis du substrat donneur, de la structure du substrat accepteur et de la position à glycosyler ainsi que de la géométrie de la liaison à former.

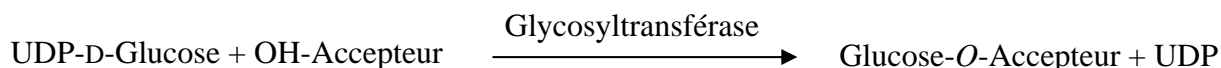


Schéma 41 : Réaction de glycosylation enzymatique

### III . 4 . C . Exemples de glycosylation enzymatique

Récemment, la synthèse enzymatique *in vitro* de l'oligosaccharide sialyl-Lewis X sur un peptide correspondant à une portion de la séquence répétitive MUC1 a été réalisée en solution (Schéma 42)<sup>112</sup>. Lors de cette synthèse, les monomères saccharidiques sont couplés les uns après les autres. A chaque étape, le peptide/glycopeptide est incubé avec la glycosyltransférase et le donneur de glycosyle adéquat dans un tampon dont le pH est ajusté en fonction de l'enzyme. Le glycopeptide est ensuite purifié avant d'être de nouveau glycosylé.

Un paramètre important est l'élimination des nucléosides mono- ou di-phosphate générés lors des réactions de glycosylation qui sont en fait des inhibiteurs de la réaction. Ceux-ci sont donc hydrolysés au fur et à mesure de leur production par la CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) ajoutée dans le milieu. On peut noter également l'utilisation d'une galactosidase à la place d'une  $\beta$ 1,3 galactosyltransférase non commerciale pour la fixation du deuxième monomère.

Cet exemple illustre parfaitement le potentiel qu'offre la glycosylation enzymatique. Cependant, dans la plupart des cas, il est difficile de glycosyler de façon homogène un peptide nu. La majorité des synthèses enzymatiques de glycopeptides consiste donc à réaliser par voie enzymatique l'élongation de la chaîne saccharidique d'un glycopeptide possédant déjà un résidu  $\alpha$ -GalNAc, ce glycopeptide pouvant être synthétisé sur support solide selon la méthode précédemment décrite. Cette approche avait déjà été utilisée par Leppänen et ses collaborateurs pour la synthèse d'un glycopeptide correspondant à la « P-selectin-glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) et portant un groupement sialyl-LewisX<sup>113</sup>. A partir du peptide glycosylé avec le résidu  $\alpha$ -GalNAc, la synthèse enzymatique du sialyl-Lewis X a été

réalisée selon la même séquence que celle décrite dans l'exemple ci-dessus. La glycosylation enzymatique est particulièrement intéressante pour la synthèse de glycopeptides sialylés, difficile à préparer par voie chimique.

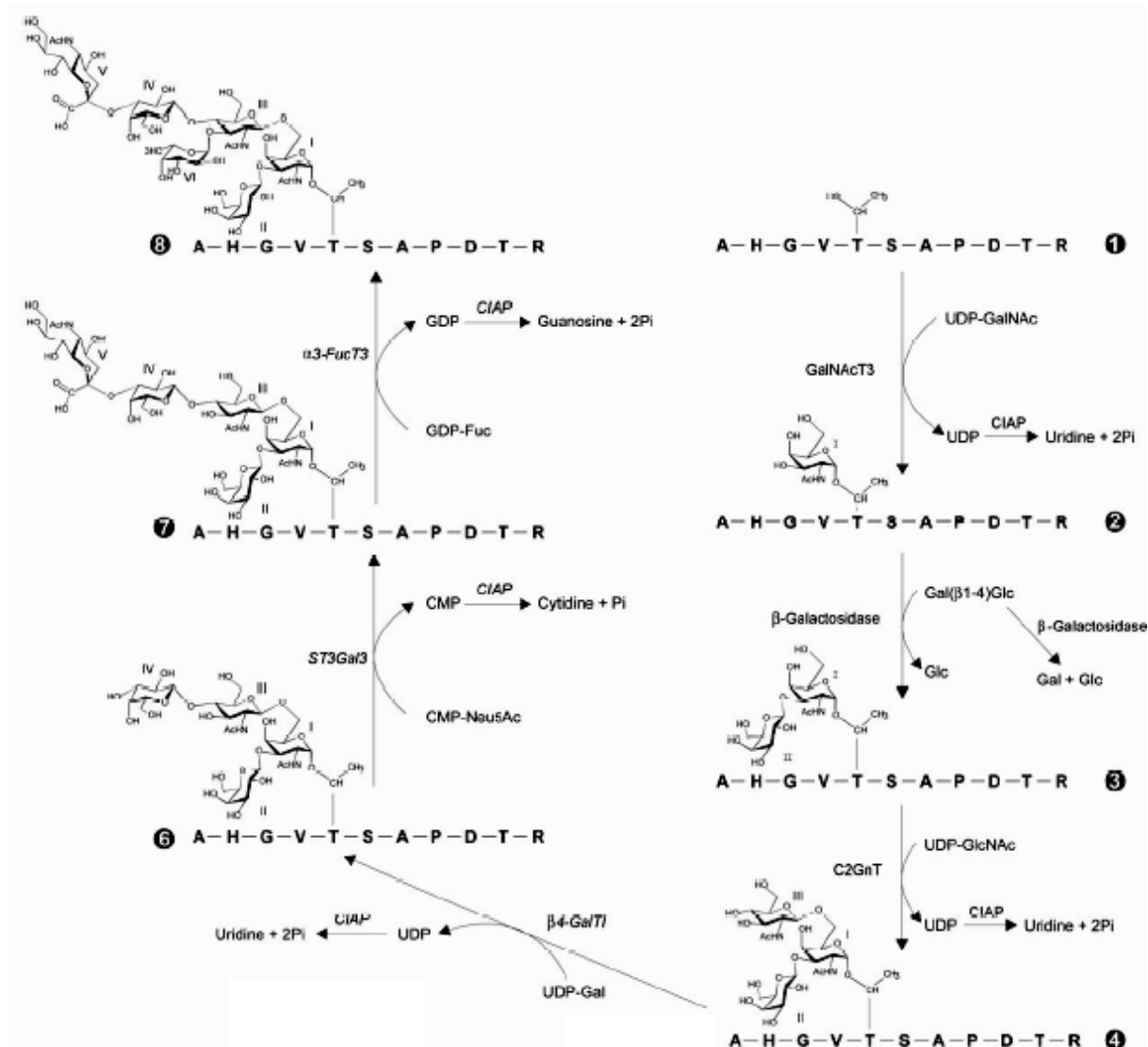
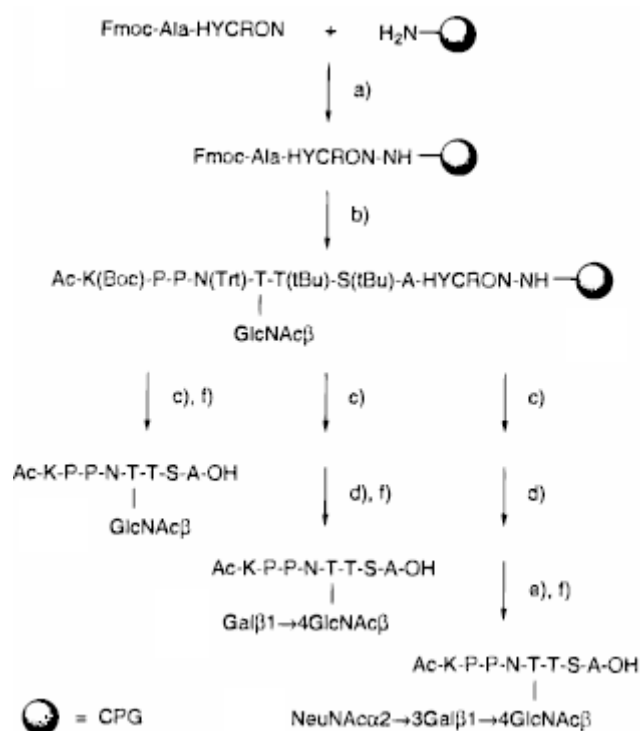


Schéma 42 : Synthèse d'un glycopeptide sialyl-Lewis X par glycosylation enzymatique (Callego et al<sup>112</sup>)

Un développement intéressant de la glycosylation enzymatique est la glycosylation sur support solide. En effet, celle-ci, évite toutes les manipulations intermédiaires nécessaires pour extraire le peptide du milieu d'incubation à chaque étape. Lors de la glycosylation enzymatique, les fonctions alcool des oligosaccharides sont déprotégées, la glycosylation sur support solide nécessite donc d'utiliser un bras espaceur qui soit coupé dans des conditions douces compatibles avec la présence d'oligosaccharides déprotégés. Le linker HYCRON développé par Kunz et ses collaborateurs<sup>31a</sup> est très utile à cette fin. Il est également nécessaire d'utiliser une résine polaire compatible avec les réactions enzymatiques qui

s'effectuent en milieu aqueux. Seitz et Wong ont ainsi synthétisé plusieurs glycopeptides sur support solide par voie enzymatique<sup>114</sup>. Le résidu Fmoc-Thr( $\beta$ -GlcNAC)-OH a été introduit lors de l'élongation d'un peptide KPPNTTSA sur une résine polaire CPG (Controlled-Pore Glass) muni du linker HYCRON. Après déprotection des chaînes latérales, deux glycosylations enzymatiques successives avec les résidus galactose et acide *N*-acétylneuraminique ont été réalisées. Le glycopeptide a ensuite été séparé de la résine par un traitement Pd(O) compatible avec la présence de l'oligosaccharide déprotégé (Schéma 43).



a) HBTU, HOBt ; b) Elongation c) TFA / Ethanedithiol / H<sub>2</sub>O 40/1/1 ; d) UDP-Gal, GalTase e) CMP-NeuNAc, SialTase ; f) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, morpholine, DMF, DMSO

Schéma 43 : Glycosylation enzymatique sur support solide avec le linker HYCRON (Seitz et Wong<sup>114</sup>)

### III . 5 . Synthèse de glycopeptides par ligation chimique

De même que les réactions enzymatiques, les réactions de ligation chimique présentent l'avantage d'être réalisées dans des conditions douces et sélectives et sont donc compatibles avec la polyfonctionnalité des peptides et des saccharides.

La ligation chimique est cependant beaucoup plus flexible que les réactions enzymatiques qui doivent être adaptées au cas par cas en fonction de l'enzyme, du substrat, et de la réaction. Plusieurs méthodes ont donc été développées pour utiliser la ligation chimique pour la synthèse de glycopeptides. Celles-ci consistent soit à fixer des mono-/oligosaccharides sur un peptide ou un glycopeptide soit à assembler deux glycopeptides afin d'obtenir une glycoprotéine de taille plus importante.

#### III . 5 . A . Fixation des saccharides par ligation chimique

La ligation chimique entre un peptide et un groupement saccharidique demande la fonctionnalisation des deux partenaires par deux groupes fonctionnels spécifiquement réactifs.

La synthèse d'oligosaccharides portant une fonction aminoxy en position anomérique peut être réalisée selon la stratégie développée par Cao *et al*<sup>115</sup>. Il s'agit de la glycosylation par transfert de phase du NHS (*N*-hydroxysuccinimide). Du fait de la présence d'un groupe participant en position 2, la liaison  $\beta$  est obtenue sélectivement. L'hydrazinolyse du *O*-glycosyl-*N*-hydroxysuccinimide ainsi obtenu, génère, en même temps que la déprotection des fonctions acétal, la fonction aminoxy (Schéma 44).

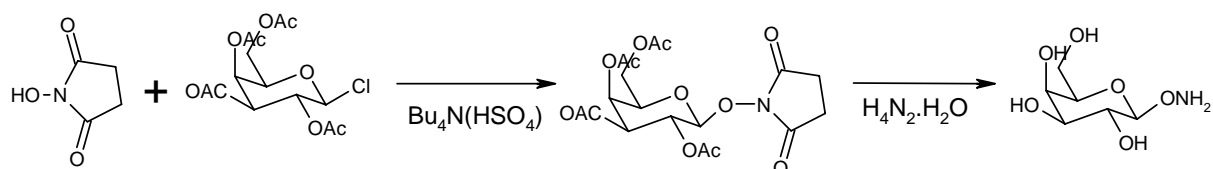


Schéma 44 : Synthèse de  $\beta$ -Gal-ONH<sub>2</sub> (d'après Cao *et al*<sup>115</sup>)

Bertozi et ses collaborateurs ont adapté cette méthode pour la synthèse d'un résidu  $\alpha$ -GalNAc-ONH<sub>2</sub><sup>116</sup>. La même réaction de glycosylation (Schéma 45) du NHS par le galactose portant en position 2 une fonction azido non participante permet d'obtenir une liaison *O*-

glycosidique  $\alpha$ . Avant l'hydrazinolyse, la fonction azido est réduite et acétylée afin d'obtenir la fonction acétamido.

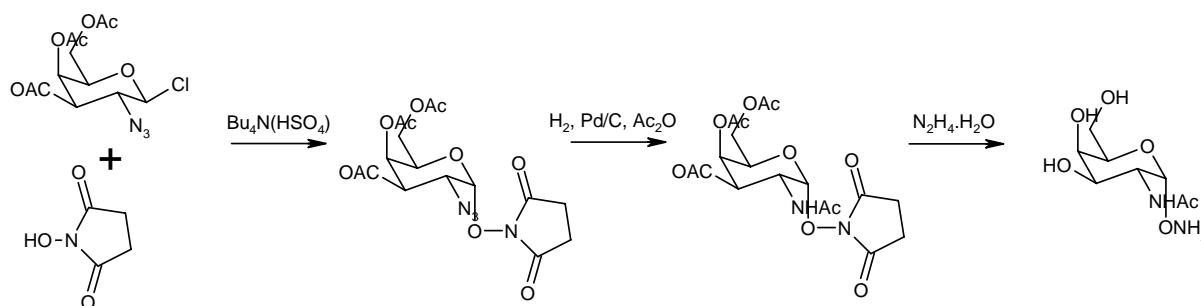


Schéma 45 : Synthèse de  $\alpha$ -GalNAc-ONH<sub>2</sub> (Marcaurrelle *et al*<sup>116</sup>)

De tels glycosyles fonctionnalisés par une fonction aminooxy peuvent être couplés par ligation chimique sur un peptide possédant une fonction cétone pour former une liaison oxime. Nous avons vu dans le précédent chapitre la possibilité de synthétiser un tel peptide en incorporant l'acide aminolévulinique lors de l'élongation du peptide<sup>91</sup>.

Bertozzi et ses collaborateurs<sup>116</sup> ont ainsi couplé le glycosyle  $\alpha$ -GalNAc-ONH<sub>2</sub> sur un peptide correspondant à la séquence de la drosocine, un petit glycopeptide bactéricide, où la thréonine 11 glycosylée à l'état naturel a été remplacée par l'acide aminolévulinique (Schéma 46). Ce glycopeptide a montré une activité biologique nettement supérieure à celle du peptide non glycosylé et sensiblement égal à la drosocine naturelle.

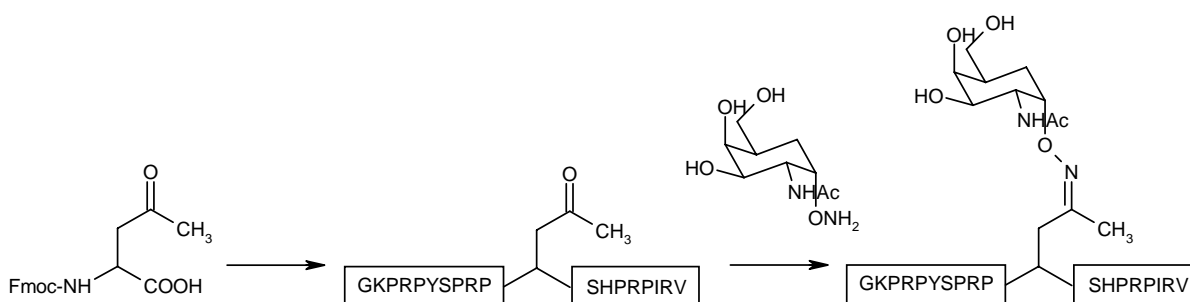


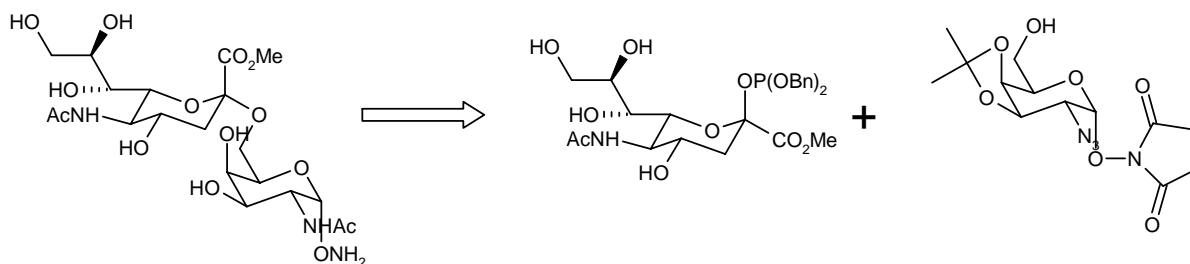
Schéma 46 : Glycosylation de la drosocine par ligation chimique (Marcaurrelle *et al*<sup>116</sup>)

Cette stratégie a récemment été utilisée par Dumy et ses collaborateurs pour la ligation de glycosyles aminooxy sur des RAFT fonctionnalisés par des aldéhydes<sup>117</sup> ou des cétones<sup>118</sup>.

D'autres glycosyles aminooxy plus complexes ont été synthétisés. Le disaccharide sialyl-Tn a par exemple été préparé par glycosylation chimique de l'intermédiaire  $\alpha$ -N-hydroxysuccinimidoglycoside (Schéma 47) puis intégré dans deux peptides correspondant aux



résidus 20-31 ou 78-95 de la mucine endothéliale Glycam-1 où les sérines et thréonines ont été remplacées par l'acide aminolévulinique<sup>119</sup>.



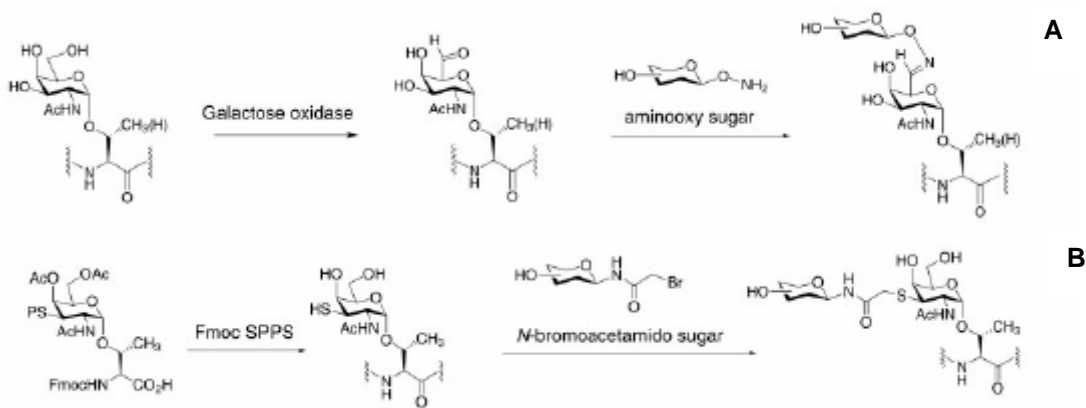
**Schéma 47** : Préparation du disaccharide silayl-Tn aminoxy (d'après Marcaurelle *et al*<sup>119</sup>)

La glycosylation enzymatique a également été utilisée pour la synthèse d'oligosaccharide à partir de mono- ou disaccharides fonctionnalisés par un aminoxy. L'oligosaccharide sialyl Lewis X a par exemple été synthétisé par glycosylation enzymatique du disaccharide  $\beta$ -Gal( $\beta_{1-3}$ )Glc-ONH<sub>2</sub><sup>120</sup>. Il est important de noter que la présence de la fonction aminoxy n'affecte pas cette réaction de glycosylation. Dans cette même étude, deux disaccharides Gal( $\beta_{1-3}$ )Glc ou GalNAc( $\beta_{1-3}$ )GlcNAc fonctionnalisés par des fonctions hydrazides ou thiosemicarbazides en position  $\beta$  ont également été synthétisés.

Par des méthodes chimiques ou chimioenzymatiques, il est donc possible d'avoir accès à une large gamme d'oligosaccharides fonctionnalisés pouvant être couplés par ligation chimique sur un peptide portant une fonction cétone ou aldéhyde.

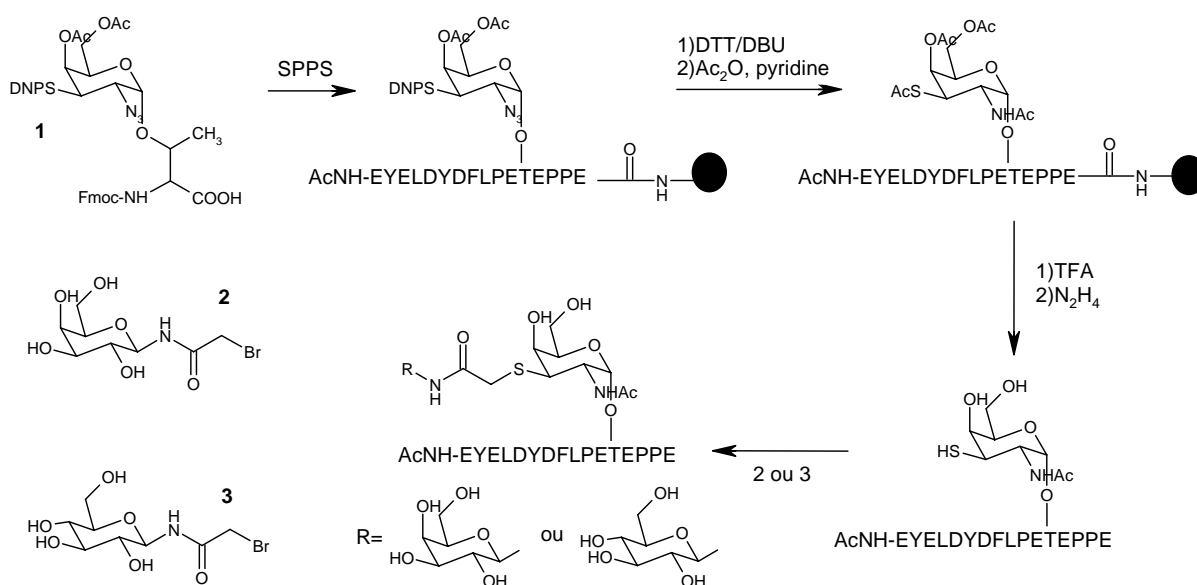
Afin de conserver une liaison *O*-glycosidique native entre le peptide et l'oligosaccharide, la ligation chimique peut aussi être utilisée pour ajouter des monomères saccharidiques sur un glycopeptide synthétisé sur support solide selon les stratégies décrites précédemment. Dans le cas de glycopeptides de type mucines, les saccharides sont fixés en position 3 et 6 du premier résidu  $\alpha$ -GalNAc. Il est donc nécessaire de pouvoir fonctionnaliser ces deux positions de façon orthogonale.

L'alcool en position 6 peut facilement être oxydé par la galactose oxydase. Une fonction aldéhyde est ainsi obtenue permettant la ligation avec des glycosyles aminoxy (schéma 48 A)<sup>121</sup>. L'alcool en position 6 peut quant à lui être fonctionnalisé sous forme d'un thiol afin de réaliser une ligation thioéther avec un glycosyle fonctionnalisé par un bromoacétate (Schéma 48 B)<sup>122</sup>.



**Schéma 48** : glycosylation par ligation chimique en position 6 (A) et 3 (B) d'un glycopeptide (dans Marcaurelle et Bertozzi<sup>101</sup>)

Cette deuxième méthode permettant la ligation sur la position 3 a été appliquée à la synthèse d'un fragment de la PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) (Schéma 49)<sup>122</sup>. Une thréonine glycosylée (**1**) portant en position 3 une fonction thiol protégée un groupe dinitrophényl (DNPS) a été introduite dans le peptide lors de l'élongation. La fonction thiol a ensuite été déprotégée et acétylée sur résine en même temps que la réduction et l'acétylation de la fonction azido par un traitement DTT(dithiothreitol)/DBU(1,8-diazabicyclo[5-4-0]undec-7-ene) suivi d'un traitement à l'anhydride acétique. Après coupure du peptide de la résine, les groupements acétyles ont été éliminés par hydrazinolyse. Deux glycosyles *N*-bromoacétamide (**2**) et (**3**) préparés par acylation des deux glycosylamines correspondantes par l'anhydride bromoacétique ont été couplés avec succès en position 3 du glycopeptide obtenu.



**Schéma 49** : Synthèse de glycopeptide par ligation thioéther (d'après Marcaurelle et Bertozzi<sup>122</sup>)

### III.5.B. Utilisation de la ligation native pour la synthèse de glycoprotéines

Les différentes méthodes que nous venons d'étudier au cours de ce chapitre permettent

- la synthèse de glycopeptides sur support solide à partir d'acides aminés préalablement glycosylés avec l'oligosaccharide souhaité.

- la glycosylation enzymatique de peptides (de préférence portant déjà un résidu saccharidique) en solution ou sur support solide.

- l'introduction par ligation chimique d'oligosaccharides sur un peptide ou un glycopeptide.

Ces méthodes sont en fait toutes limitées par la taille du peptide pouvant être synthétisé sur support solide. Afin d'obtenir des glycoprotéines de taille plus importante, la ligation chimique entre deux glycopeptides semble tout à fait appropriée.

La synthèse d'une chimiokine de 93 résidus, la lymphotactine, contenant huit sites glycosylés a ainsi été synthétisée par ligation native entre le peptide 1-47 fonctionnalisé côté C-terminal par un thioester et le glycopeptide 49-93 portant une cystéine côté N-terminale (schéma 50)<sup>90</sup>.

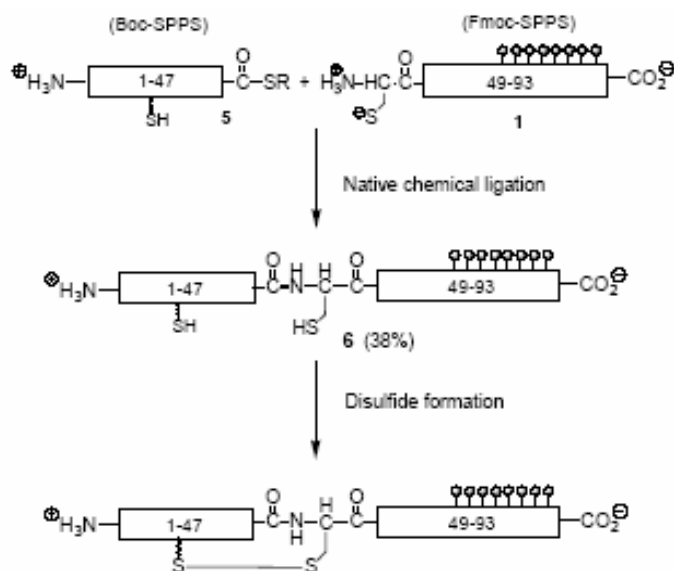


Schéma 50 : Synthèse de la lymphotactine par ligation chimique (Marcaurrelle *et al*<sup>90</sup>)

Le peptide 49-93 possédant huit résidus  $\alpha$ -GalNAc a été synthétisé sur support solide à partir du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH. En ce qui concerne le peptide thioester celui-ci a été préparé de façon classique en stratégie Boc.

Pour la préparation de peptides thioester glycosylés, Bertozzy et ses collaborateurs<sup>123</sup> ont mis au point une nouvelle méthode de synthèse selon la stratégie Fmoc/tBu plus compatible avec la présence de résidus glycosylés que la stratégie Boc. Cette synthèse est basée sur l'utilisation d'un linker alkanesulfonamide « safety cash ». L'élongation du glycopeptide est réalisée comme précédemment à partir du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNac)-OH sur une résine commerciale 4-sulfamylbutyryl AM (**1**) (Schéma 51). Le dernier acide aminé est protégé par un Boc. Après alkylation de l'azote de la sulfonamide, le peptide thioester est libéré par déplacement nucléophile et le Boc est éliminé par un traitement TFA. Cette méthode a été appliquée pour la synthèse du fragment 1-24 de la diptéricine, une glycoprotéine antimicrobienne, qui a ensuite été condensé avec le fragment 25-82 (schéma 51 et 52).

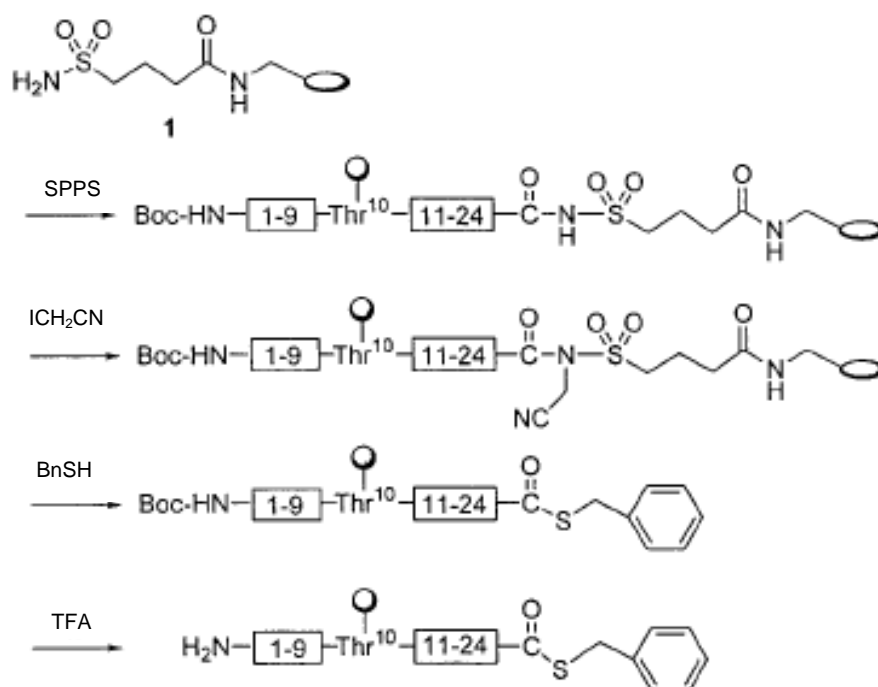


Schéma 51 : Synthèse du glycopeptide 1-24 de la diptéricine fonctionnalisée par un thioester (Shin et al<sup>123</sup>)

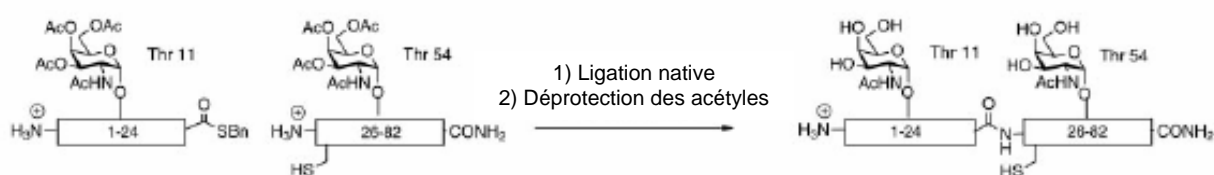


Schéma 52 : Synthèse de la diptéricine par ligation native (dans Grogan et al<sup>124</sup>)

### **III . 6 . Conclusion**

Nous venons de voir dans ce chapitre les différentes méthodes de synthèse de glycopeptides couramment utilisées. Ces différentes méthodes ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients et sont en fait complémentaires. Ainsi, un glycopeptide portant des résidus  $\alpha$ -GalNAc peut facilement être synthétisé par SPPS en introduisant lors de l'élongation les synthons Fmoc-Thr/Ser(GalNAc)-OH. Pour la synthèse de glycopeptides portant des résidus saccharidiques plus complexes, cette approche s'avère être plus délicate. Il est par contre beaucoup plus facile d'introduire des groupements saccharidiques supplémentaires soit par glycosylation enzymatique soit par ligation chimique.

La ligation chimique permet également d'assembler deux glycopeptides afin de repousser les limites de la SPPS quant à la taille des glycopeptides pouvant être obtenus.

En conclusion, il nous semble avoir maintenant entre nos mains les outils bibliographiques nécessaires à la synthèse de constructions glycoprotéiques originales capables d'induire une réponse immunitaire contre MUC1 tumorale dont nous avons montré l'intérêt pour le développement d'une approche immunothérapeutique active.

## **Résultats et discussion**

## I. Rappels des objectifs

Les antigènes associés à la forme tumorale de la protéine MUC1 sont des cibles prometteuses pour l'immunothérapie des cancers épithéliaux. Dans ce contexte, nous souhaitons synthétiser des immunogènes qui imiteraient ces antigènes tumoraux afin de stimuler la production d'anticorps spécifiques dirigés contre MUC1 tumorale.

Nous avons vu précédemment la nécessité d'introduire à la fois les antigènes peptidiques et saccharidiques. Les immunogènes seront donc basés sur la séquence Muc1 glycosylée. D'autre part, nous avons montré l'intérêt des MAP et des MAG pour la conception de vaccins synthétiques. De même, nous souhaitons introduire plusieurs copies de cette séquence sous une présentation branchée. Enfin, nous souhaitons ajouter à notre construction un épitope T-auxiliaire qui devrait permettre de stimuler une réponse humorale T-dépendante.

De tels immunogènes qui devront être des composés chimiquement définis se présenteraient donc comme représenté sur la figure 18.

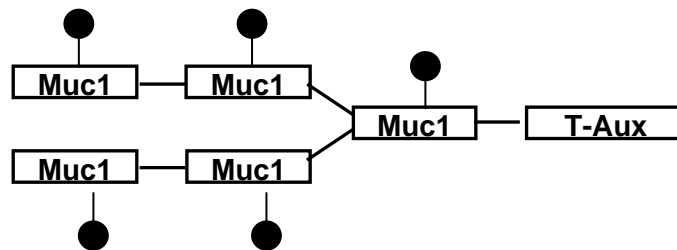


Figure 18 : Représentation schématique des immunogènes souhaités

Afin de pouvoir comparer facilement différentes molécules de ce type nous souhaitons mettre au point une méthode de synthèse modulaire. L'objectif de cette thèse est donc **la mise au point d'une méthode robuste de synthèse de petites protéines modulaires glycosylées.**

La ligation chimique dont nous avons vu l'intérêt pour la synthèse de protéines de taille relativement importante et également de glycoprotéines sera un outil précieux pour la réalisation de telles synthèses.

## II . Synthèse modulaire d'une petite protéine triantennée contenant des liaisons oxime

### II . 1 . Présentation de la chimère et schéma rétrosynthétique

La première partie de ce travail a consisté à développer la synthèse de petites protéines non glycosylées contenant trois modules peptidiques assemblés selon une présentation branchée par des liaisons oxime. Cette liaison a été choisie pour des raisons chimiques et biologiques :

-l'efficacité et la sélectivité de la réaction d'oximation<sup>62, 66, 72, 75</sup>, ainsi que la stabilité de la liaison sur une large gamme de pH autour du pH physiologique<sup>74, 75</sup>.

-la compatibilité de cette liaison avec l'induction *in vivo* d'une réponse immunitaire<sup>76, 77</sup>.

Les modules peptidiques choisis pour la mise au point de cette synthèse sont deux modules Muc1 (appelés Muc par la suite) fixés l'un par l'extrémité C-terminale et l'autre par l'extrémité N-terminale et le module PADRE (Pan DR Epitope), une séquence peptidique artificielle conçue pour être un épitope T auxiliaire universel très efficace<sup>125</sup>. La chimère synthétisée Muc(Muc)PADRE (**1**) peut être représentée schématiquement de la façon suivante (Figure 19) :

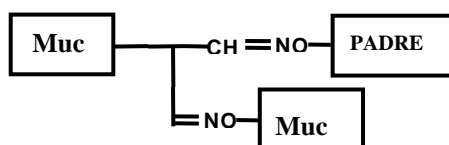


Figure 19 : Représentation schématique de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)

La liaison oxime étant obtenue par condensation d'un aminoxy sur un aldéhyde, la chimère triantennée Muc(Muc)PADRE (**1**) a été élaborée à partir d'un peptide Muc portant deux fonctions aldéhyde masquées de façon orthogonales sur lesquelles ont été condensées successivement, après déprotection de chacune des fonctions, un peptide Muc aminoxy (Aoa-Muc) (**3**) et un peptide PADRE aminoxy (Aoa-PADRE) (**2**) (Schéma 53).



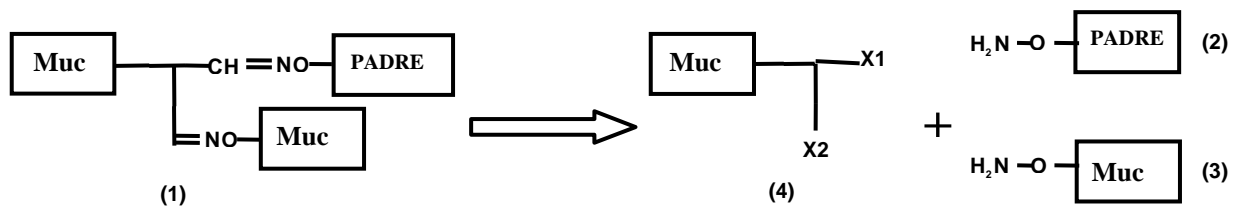


Schéma 53 : Schéma rétrosynthétique de la chimère Muc(Muc)PADRE (1).  
 X1,2 : fonctions aldéhydes masquées de façon orthogonale

Avant la synthèse de la chimère, les synthèses des 2 synthons Aoa-PADRE (2) et Aoa-Muc (3) et du synthon Muc dialdéhyde masqué (4) doivent être mise au point.

## II. 2 . Synthèse des synthons aminoxy

### II. 2 . A . Aoa-Muc (3)

La synthèse du partenaire Aoa-Muc (**3**) ( $\text{H}_2\text{N-O-CH}_2\text{-CO-PPAHGVTSPDTRPAPGSTA-OH}$ ) est représentée sur le schéma 54. L'élongation de la séquence Muc a été réalisée en phase solide selon la stratégie Fmoc/*t*Bu à partir d'une résine polystyrène munie du bras alcool p-Benzyloxybenzylique (résine de Wang)<sup>126</sup> chargée avec Fmoc-Ala-OH.

Après l'élongation de la séquence Muc, le résidu Boc-Aoa-OH a été introduit manuellement en utilisant HATU<sup>127</sup> comme agent de couplage. En effet, l'utilisation de HBTU<sup>128</sup> n'a pas permis d'obtenir une réaction de couplage totale, y compris avec un double couplage. Après déprotection des chaînes latérales par TFA, le peptide a été précipité dans l'éther diéthylique. Le groupe aminoxy étant très réactif avec les composés carbonyles tels que le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde, il est indispensable de réaliser la précipitation avec de l'éther dépourvu de traces de ces composés<sup>129</sup>.

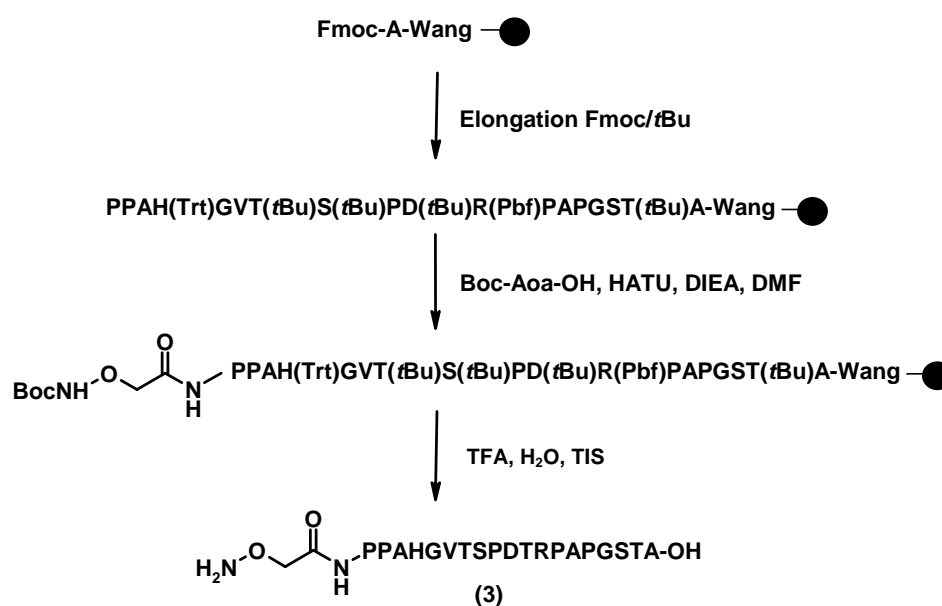


Schéma 54 : Synthèse du partenaire Aoa-Muc-OH (**3**)

Le produit brut a été analysé par HPLC. Aucun produit secondaire correspondant à une réaction d'overacylation n'a été observé. Tenant compte de la pureté satisfaisante (82%) et de la réactivité du composé, le peptide (**3**) a été directement engagé dans les réactions de ligation sans purification préalable par HPLC dont les solvants peuvent contenir des traces de composés carbonyles.

## II. 2 . B . Aoa-PADRE (2)

### II. 2 . B . a . Mise en évidence d'une séquence difficile

Dans le cas du peptide PADRE, nous souhaitons synthétiser un peptide amidé. Le peptide Aoa-PADRE (2) ( $\text{H}_2\text{N-O-CH}_2\text{-C-O-aKXVAAWTLKaa-NH}_2$  où X=cyclohexylalanine, a=D-Alanine) a donc été préparé de la même façon que le peptide Aoa-Muc (3) en utilisant un bras 4-(2',4'-Diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxy (résine Rink-amide)<sup>130</sup> à la place du bras Wang.

Lors de la première tentative d'élongation sur une résine polystyrène substituée à 0,76 mmoles/g, le suivi UV de l'adduit fluorenylméthyl-pipéridine formé après chaque déprotection du  $N^\alpha$ -Fmoc par la pipéridine a montré des couplages incomplets pour les 5 derniers acides aminés (aKXVAAWTLKaa) accompagnés par une déprotection lente du Fmoc (Figure 20 A). Un double couplage systématique de ces derniers acides aminés n'a pas permis de surmonter ce problème de façon satisfaisante (Figure 20 B). Il s'agit donc d'une "séquence difficile" décrite par Kent<sup>131</sup> comme le problème le plus sérieux de la SPPS. Ce terme est généralement appliqué quand, lors de l'élongation d'un peptide, les réactions de déprotection du  $N^\alpha$  et / ou de couplage sont incomplètes pour une série d'acides aminés et ce malgré l'augmentation des temps de réaction, l'utilisation d'agents de couplage plus puissants ou le recours à des doubles couplages.

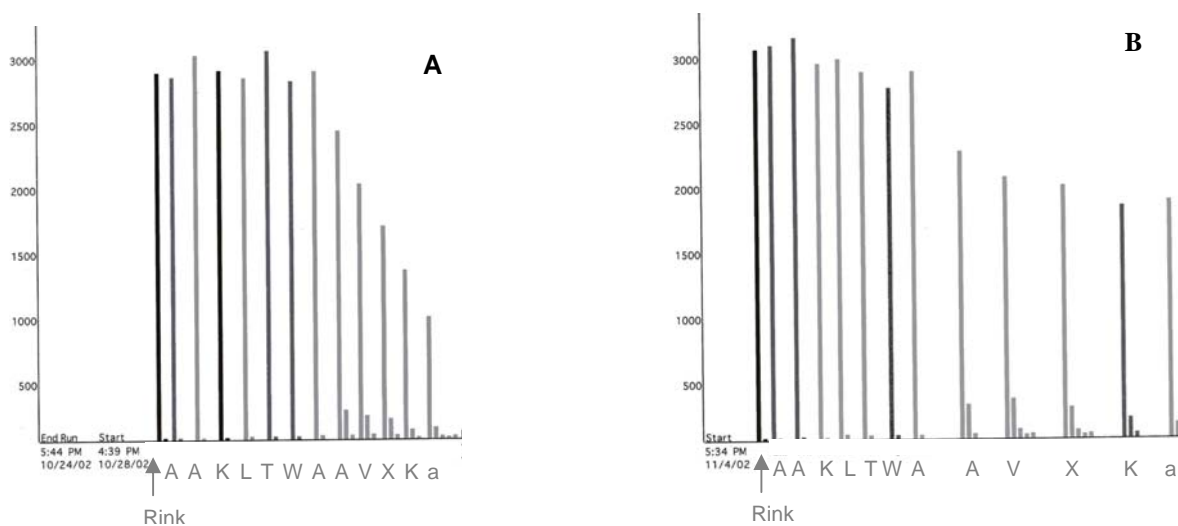


Figure 20 : Suivi UV de la déprotection du  $N^\alpha$ -Fmoc par la pipéridine au cours de l'élongation du peptide PADRE sur une résine Fmoc-Rink 0,76 mmoles/g.  
A : simple couplage, B : double couplage sur les cinq derniers acides aminés

De même que Atherton et ses collaborateurs pour la synthèse du fragment 66-104 du cytochrome c<sup>132</sup>, nous avons observé, lors de l'élongation du peptide, une contraction de la résine qui devient plus dense et prend un caractère granulaire. Ce phénomène apparaît en même temps que la diminution des rendements de couplage. L'explication proposée alors par Atherton est un phénomène d'association intermoléculaire du peptide protégé dans la matrice. Des études structurales de peptides-résine par RMN ou infrarouge ont en effet montré que, pour certaines séquences, les chaînes peptidiques s'associent entre elles par des liaisons hydrogène pour former des structures secondaires telles que les feuillets  $\beta$ <sup>133</sup>. Ceci conduit à une mauvaise solvataion du peptide dans la résine, rendant l'extrémité N-terminale du peptide inaccessible aux différents réactifs.

Le problème des séquences difficiles a stimulé de nombreuses recherches. Différentes méthodes intervenant sur des paramètres externes au peptide-résine ont été développées. Il s'agit par exemple de changer la nature des solvants<sup>134</sup>, d'utiliser des sels chaotropiques<sup>135</sup> ou de réaliser les couplages à une température élevée. D'autres solutions intervenant sur des facteurs intrinsèques ont également été proposées. Pour l'optimisation de la synthèse du PADRE, nous avons par exemple étudié l'influence du taux de substitution, de la nature de la résine ou de groupes protecteurs des amides. Ce travail a été réalisé par une stagiaire de DEA encadrée pendant cette thèse.

Les critères qui ont été étudiés pour comparer les différentes synthèses sont le profil du suivi de l'élongation par spectroscopie UV ainsi que le rendement d'élongation et la pureté du produit analysé par HPLC et spectrométrie de masse.

### **II . 2 . B . b . Taux de substitution**

En phase liquide, une solution pour faciliter la solubilisation d'un peptide qui a tendance à s'agréger est de diminuer la concentration. Parallèlement, lors de l'élongation d'un peptide en phase solide, la diminution du taux de substitution de la résine devrait diminuer les interactions entre les chaînes peptidique. Une étude réalisée par Tam et Lu<sup>136</sup> avec des modèles de peptide-résines contenant des chaînes peptidiques sous forme de cluster a montré que ce type de résine était beaucoup moins bien solvatée que pour un modèle dispersé, ceci étant corrélé avec des rendements de couplage incomplets lors de l'élongation. Par conséquent, ces auteurs ont conseillé d'utiliser des résines faiblement substituées dans le cas de séquences difficiles.

Suivant ces indications, nous avons souhaité tester l'élongation du peptide PADRE sur des résines Rink-Polystyrène différemment substituées. Pour cette étude, nous avons utilisé les résines Rink-Polystyrène commerciales à 0,76 mmoles et 0,4 mmoles/g. Afin d'obtenir une résine plus faiblement substituée, le mélange Fmoc-D-Ala/Boc-D-Ala (50/50) a été couplé sur la résine à 0,4 mmoles/g à la place du premier acide aminé. Le dosage de l'adduit fluorenylméthyl-pipéridine libéré lors de l'étape de déprotection donne un taux de substitution de 0,23 mmoles/g. Les résultats de ces trois synthèses sont rassemblés dans la figure 21 et le tableau 2.

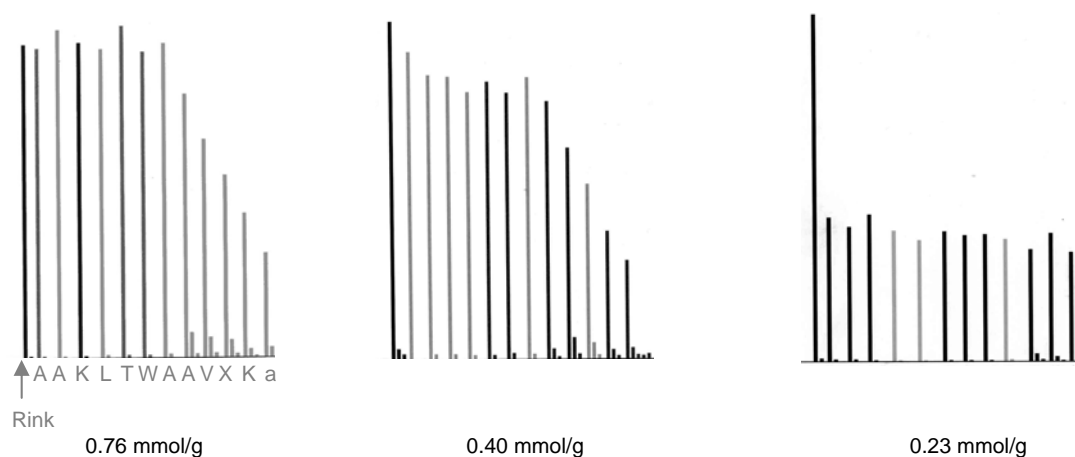


Figure 21 : Suivi par spectroscopie UV de l'élongation du PADRE sur résine polystyrène avec différents taux de substitution.

Taux de substitution (mmoles/g)	Rendement d'élongation (%)	Pureté (%)
0,76	37	ND
0,4	45	73
0,23	82	81

Tableau 2: Résultats de l'élongation du PADRE sur résine polystyrène avec différents taux de substitution

D'après le profil UV du suivi de la synthèse et le rendement d'élongation, la diminution du taux de substitution de 0,76 à 0,4 mmoles/g n'améliore que légèrement la qualité de la synthèse. Par contre, l'utilisation d'une résine faiblement substituée permet d'obtenir de bons rendements de couplage tout au long de l'élongation ce qui a pour conséquence une nette augmentation du rendement d'élongation et de la pureté du produit brut. Une diminution significative du taux de substitution permet donc de limiter les interactions entre les chaînes peptidiques.

## II. 2. B. c. Nature de la résine

Une deuxième possibilité pour diminuer les interactions intermoléculaires entre les chaînes peptidiques du peptide-résine est de modifier les propriétés du support solide. Une avancée majeure dans ce domaine a été réalisée par Sheppard et ses collaborateurs<sup>137</sup>. Ces auteurs se sont basés sur le fait que le problème des séquences difficiles devait être dû à l'incompatibilité entre les chaînes peptidiques hydrophiles et la résine polystyrène hydrophobe ainsi que les solvants apolaires tels que le dichlorométhane alors utilisés. Ils ont donc introduit l'utilisation d'une résine polydiméthylacrylamide avec un solvant aprotique dipolaire tel que le diméthylformamide. Le nouveau protocole ainsi défini a permis la préparation du fragment 65-74 de l'ACP (Acyl Carrier Protein) pour laquelle toutes les tentatives de synthèse avaient échoué<sup>138</sup>.

L'ACP a également pu être synthétisée sur une résine PEGA (PolyEthylèneGlycol Acrylamide)<sup>139</sup> ou sur une résine polystyrène réticulée avec le 1,6-hexanediol diacrylate (HDOAD-PS)<sup>140</sup> ou le 1,4-butanediol diméthacrylate (BDDMA-PS)<sup>141</sup>. Lors de ces deux dernières études, il a été montré que ces nouvelles résines gonflaient beaucoup mieux dans les différents solvants que la résine polystyrène réticulée avec le divinylbenzène (DVB-PS) classiquement utilisée. D'autre part, les études structurales par infrarouge du peptide fixé sur la résine ont montré une structure secondaire de type feuillet  $\beta$  dans le cas de la résine DVB-PS alors que dans le cas des résines BDDMA-PS ou HDOAD-PS le peptide présente une structure de type « random coil ». Ces exemples confirment le rôle non négligeable du support solide sur le comportement du peptide et en particulier sur sa tendance à former des structures secondaires.

Pour la synthèse du peptide PADRE, nous avons comparé la résine polystyrène à deux résines polaires commerciales, la résine NovaSyn® TG et la résine PEGA. La résine NovaSyn® TG<sup>142</sup> est composée de polyéthylène glycol greffé sur une résine polystyrène faiblement réticulée par le divinylbenzène (Figure 22 A). La résine PEGA<sup>139</sup>, est quant à elle constituée de diméthylacrylamide et de monoacrylamidopropyl(aminopropyl)-polyéthylène glycol réticulé avec le bisacrylamidopropyléthylène glycol (Figure 22 B).

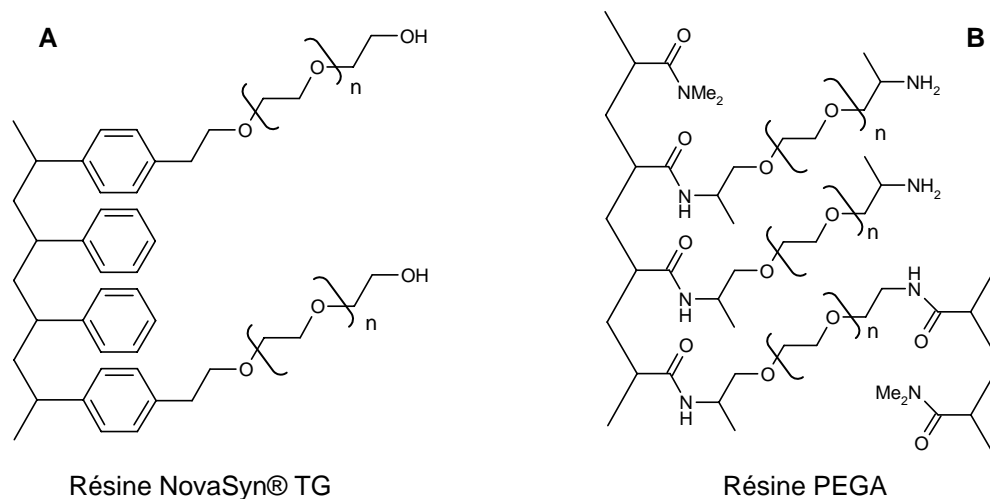


Figure 22 : Structure de la résine NovaSyn® TG et de la résine PEGA

Afin de pouvoir réaliser l'élargissement du peptide sur ces résines, nous avons couplé manuellement l'acide 4-(2',4'-Diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxy acétique sur ces résines aminométhylées. Les taux de substitution obtenus sont 0,36 mmoles/g pour la résine PEGA et 0,26 mmoles/g pour la résine NovaSyn® TG. Les résultats de la synthèse du PADRE sur ces différentes résines sont présentés sur la figure 23 et le tableau 3.

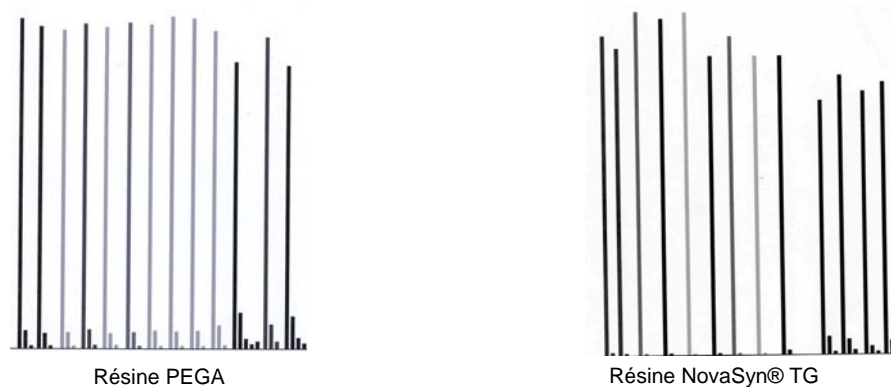


Figure 23 : Suivi par spectroscopie UV de l'élargissement du PADRE sur deux résines polaires

Résine	Taux de substitution (mmoles/g)	Rendement d'élargissement (%)	Pureté (%)
NovaSyn® TG	0,26	91	93
PEGA	0,36	87	90

Tableau 3: Résultats de l'élargissement du PADRE sur deux résines polaires

Les résultats obtenus avec la résine PEGA sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus par différents auteurs pour la synthèse de l'ACP sur des résines polaires<sup>139, 140, 141</sup>. De plus, l'effet de contraction de la résine n'est plus observé. L'utilisation de cette résine favorise donc la solvataion du peptide même à un taux de substitution de 0,36 mmoles/g et permet d'obtenir de bons rendements d'élongation.

La synthèse réalisée sur la résine NovaSyn® TG à 0,26 mmoles/g (Tableau 3) doit être comparée à celle réalisée sur la résine polystyrène à 0,23 mmoles/g (Tableau 2). Nous avons déjà montré l'intérêt d'un faible taux de substitution, l'utilisation d'une résine polaire semble ici faciliter encore la synthèse puisqu'on obtient un meilleur rendement d'élongation et une meilleure pureté.

Ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser des résines polaires pour la synthèse de séquences difficiles. Cependant, ils ne nous permettent pas de tirer des conclusions quant à la différence d'efficacité entre la résine PEGA et la résine NovaSyn® TG qui n'ont pas le même taux de substitution.

## **II . 2 . B . d . Groupements protecteurs de l'amide secondaire**

Dans les paragraphes précédents, nous avons étudié des paramètres concernant soit le peptide-résine soit la résine seule. Afin de diminuer les liaisons hydrogène, principales causes des phénomènes d'agrégation, il est également possible d'agir sur les paramètres intrinsèques de la chaîne peptidique en protégeant l'amide secondaire qui est alors remplacée par un amide tertiaire. Ceci élimine l'hydrogène impliqué dans le réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires.

Un premier groupe protecteur pouvant être utilisé pour protéger les amides secondaires est le Hmb (*N*-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl))<sup>143</sup>. Le groupe Hmb est intégré dans un peptide sous forme de *N,O*-bis(Fmoc)-*N*-(Hmb) aminoacide (Schéma 55). Après élimination des Fmoc, le couplage s'effectue sur l'oxygène en ortho. Cette réaction, catalysée de façon interne par l'azote basique, est ensuite suivie d'un *O,N*-transfert d'acyle pour former la liaison amide tertiaire. Ce deuxième couplage est tout de même difficile du fait de l'encombrement stérique. Afin de limiter cet encombrement le Hmb est uniquement utilisé sur les résidus glycine ou alanine (R=H ou CH<sub>3</sub>). Après l'élongation, le groupement Hmb est éliminé par un traitement TFA.



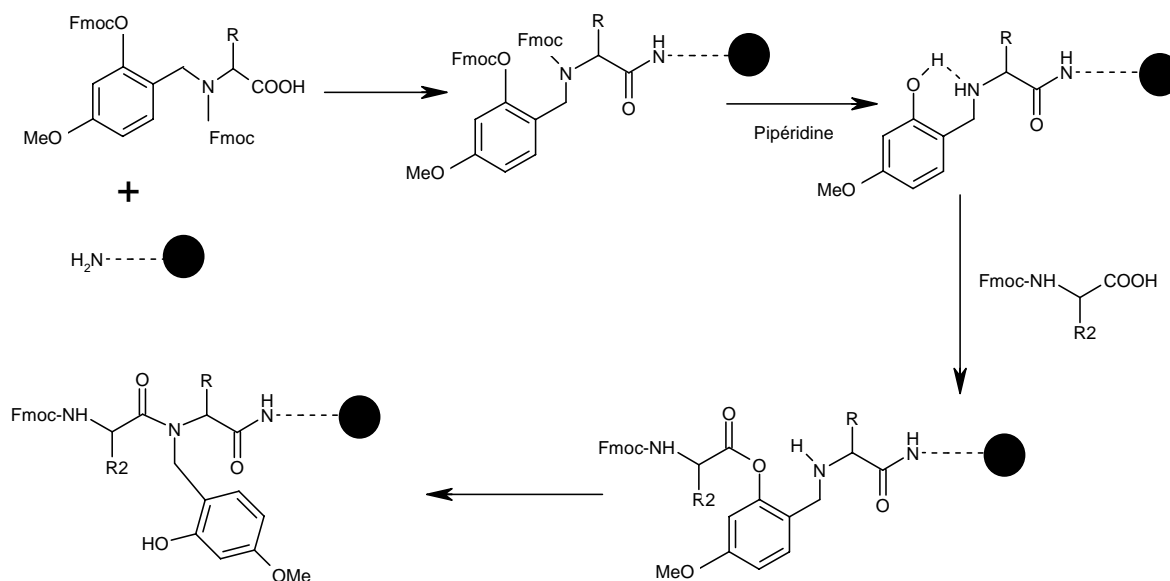


Schéma 55 : Incorporation du groupe protecteur Hmb dans un peptide

Dans le cas de la synthèse du PADRE, nous avons introduit, lors de l'élongation sur une résine polystyrène à 0,4 mmoles/g, l'acide aminé Fmoc-(Fmoc-Hmb)-Ala-OH en position 6 et 11 (aKXVAAWTLKAa). Des doubles couplages ont été réalisés pour les acides aminés 5 et 10. Le profil du suivi de l'élongation par spectroscopie UV (Figure 24) montre une synthèse problématique.

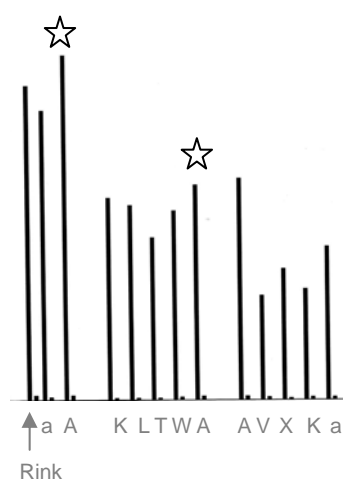


Figure 24 : Suivi par spectroscopie UV de l'élongation du PADRE sur une résine polystyrène avec le Hmb comme protecteurs d'amides.

En théorie, les deux pics marqués d'une étoile correspondants à la déprotection de Fmoc-(Fmoc-Hmb)-Ala-OH devraient être d'une intensité deux fois supérieure aux autres puisque deux Fmoc sont libérés simultanément. On constate ici qu'ils sont de même intensité que les pics précédents, c'est donc l'acide aminé protégé par un Hmb lui-même et non pas le

suivant qui est difficile à coupler. De façon étrange, le pic de déprotection de l'alanine 5 est de même intensité que celui de l'alanine 6 alors qu'il devrait être deux fois plus petit. Un mauvais couplage est ensuite observé pour la valine, ce qui semblerait indiquer l'inefficacité du groupe Hmb. Si le rendement d'élongation est supérieur à la synthèse réalisée sur la même résine sans l'utilisation du groupement Hmb, la pureté du produit brut est ici médiocre (Tableau 4).

Résine polystyrène 0,4 mmoles/g	Rendement d'élongation (%)	Pureté (%)
sans Hmb	45	73
avec Hmb	60	33

Tableau 4: Comparaison des résultats de l'élongation du PADRE sur résine polystyrène avec et sans utilisation de l'Hmb

Une autre possibilité pour protéger les amides secondaires est l'utilisation des pseudoprolines développées par Mutter et ses collaborateurs<sup>144</sup>. Celles-ci résultent de la cyclisation d'un acide aminé alcool en présence d'acétone pour conduire à une oxazolidine substituée. L'oxazolidine est stable au cours de l'élongation Fmoc/*t*Bu et l'acide aminé alcool est régénéré en fin de synthèse par une acidolyse en présence de TFA. Diminuant les capacités du peptide à former des structures secondaires, les pseudoprolines ont été utilisées pour la synthèse de la protéine FDD (FAS death domain), une protéine de 95 acides aminés impliquée dans la mort cellulaire. En pratique, les pseudoprolines s'introduisent sous forme de dipeptides (Figure 25). Ces dipeptides sont commercialisés et sont introduits dans la séquence de la même façon que n'importe quel acide aminé.

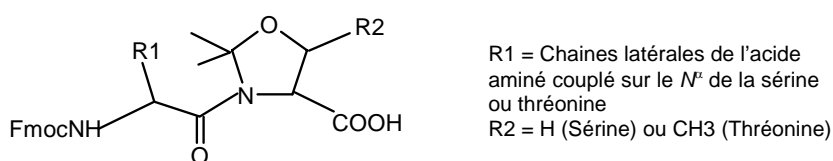
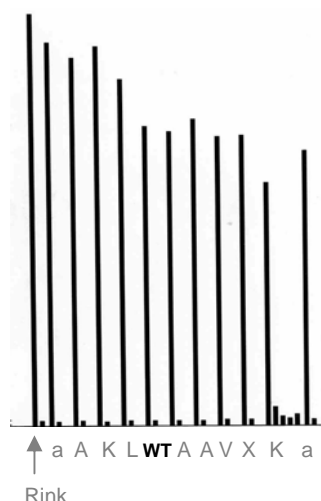


Figure 25 : Dipeptide Fmoc-AA-Thr/Ser ( $\psi^{\text{Me, Me}}$ , Pro)-OH

Pour la synthèse du peptide PADRE nous avons utilisé le dipeptide Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\psi^{\text{Me, Me}}$ , Pro)-OH à la place des résidus 7 et 8 (aKXVAAWTLKAA). L'élongation a été réalisée sur une résine polystyrène à 0,4 mmoles/g. Malgré une diminution progressive des pics sur le profil du suivi de l'élongation par spectroscopie UV (Figure 26), le rendement d'élongation est de 89 % et le produit brut a une pureté satisfaisante de 87%.



**Figure 26 :** Suivi par spectroscopie UV de l'élongation du PADRE sur une résine polystyrène avec une pseudoproline comme protecteur d'amide

Cette étude de la synthèse du peptide PADRE nous a permis de confirmer l'importance du choix du taux de substitution et de la résine lors de la synthèse de séquence difficile. Les résultats ainsi obtenus en abaissant le taux de substitution ou en utilisant une résine polaire sont en fait aussi satisfaisants que ceux obtenus avec la pseudoproline mais à un moindre coût. Il est par contre possible d'imaginer que la combinaison de ces différentes solutions permettrait d'obtenir un rendement d'élongation supérieur et ainsi un peptide brut de meilleure qualité. L'utilisation de l'Hmb comme groupe protecteur est par contre ici fortement déconseillé. Comme nous le verrons par la suite, ces résultats ont été appliqués à la synthèse de peptides plus longs contenant la séquence PADRE.

### **II . 2 . B . e . Synthèse du peptide Aoa-PADRE (2)**

Le synthon Aoa-PADRE (2) a été préparé sur la résine Rink-NovaSyn® TG de la même façon que le peptide Aoa-Muc (3). Après l'élongation, le résidu Boc-Aoa-OH a été couplé manuellement en utilisant HATU comme agent de couplage. Après déprotection des chaînes latérales par TFA, le peptide a été précipité dans l'éther diéthylique dépourvu de traces de composés carbonylés. Le produit brut a été analysé par HPLC. Aucun produit secondaire correspondant à une réaction d'overacylation n'a été observé. De même que le peptide Aoa-Muc (3), le peptide (2), de pureté satisfaisante (80 %), a été directement engagé dans les réactions de ligation sans purification préalable par HPLC.

## II. 3 . Synthèse du synthon Muc dialdéhyde masqué (4)

### II. 3 . A . Présentation du synthon

Notre stratégie, décrite précédemment, pour la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) consiste à condenser les deux partenaires Aoa-Muc (3) et Aoa-PADRE (2) sur un synthon Muc dialdéhyde masqué (4) (Schéma 56). Après avoir préparé les synthons Aoa-Muc (3) et Aoa-PADRE (2), nous nous intéressons maintenant à la synthèse du peptide (4) possédant deux fonctions aldéhydes positionnées coté C-terminal en position branchée et protégées de façon orthogonale.

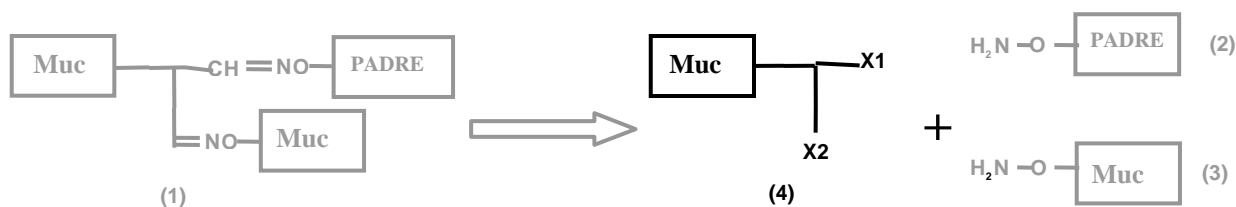


Schéma 56 : Représentation du synthon Muc dialdéhyde masqué (4)  
X1,2 : fonctions aldéhydes masquées de façon orthogonale

La première fonction aldéhyde masquée X<sub>1</sub> a été introduite sous forme d'un acétal obtenu par aminolyse du bras PAM. Le bras PAM est stable en milieu basique ainsi qu'en milieu acide moyen<sup>86</sup>, il est par contre sensible aux attaques nucléophiles. L'utilisation de ce bras, permet donc de réaliser l'élongation du peptide selon la stratégie Fmoc/*t*Bu, de déprotéger les chaînes latérales du peptides, puis d'effectuer un déplacement nucléophile par le diméthyl acétaldéhyde diméthylacétal<sup>87</sup>. La fonction acétal du peptide obtenu peut alors être déprotégée en milieu acide (Schéma 57).

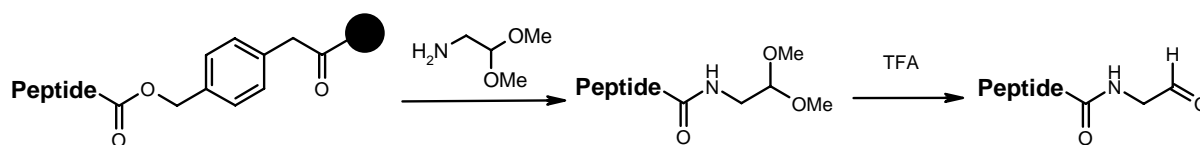


Schéma 57 : Préparation d'un peptide-aldéhyde C-terminale par Aminolyse

En ce qui nous concerne, le peptide synthétisé devra correspondre à la séquence Muc (PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA). Une alanine supplémentaire devra être ajoutée en position N-terminale afin d'éviter, comme nous le verrons par la suite, l'élimination des deux prolines qui peut se produire lors de l'aminolyse. La résine choisie pour l'élongation de ce peptide est

la résine PEGA qui est une résine polaire et qui, d'après de précédents résultats<sup>88</sup>, est la plus appropriée pour l'aminolyse de peptides polaires supérieurs à 10 acides aminés.

La deuxième fonction aldéhyde masqué X<sub>2</sub> a été introduite sous forme d'un 2-aminoalcool, pouvant être oxydé par NaIO<sub>4</sub>. Cette méthode est classiquement utilisée pour l'obtention de peptide-aldéhyde, le 2-aminoalcool introduit est alors une sérine N-terminale (Schéma 58)<sup>79</sup>.

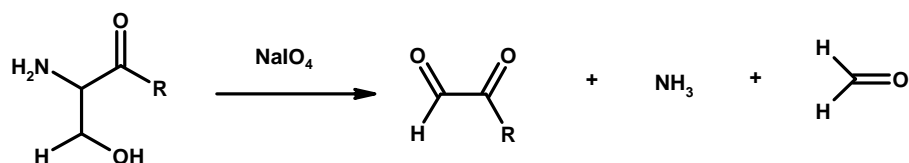


Schéma 58 : Oxydation d'une sérine N-terminale par le periodate de sodium

Dans notre cas la sérine a été couplée sur le ε-NH<sub>2</sub> d'une lysine introduite en position C-terminale de la séquence Muc1. Une alanine a été ajoutée coté C-terminal de cette lysine car les acides aminés encombrés sont connus pour influencer défavorablement les rendements de réactions lors de déplacements nucléophiles<sup>89,90</sup>.

Le synthon Muc1 dialdéhyde masqué (4) est donc le peptide A-Muc-K(S)-A-NH-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, « Muc(Ser)Acétal » obtenu par aminolyse du peptide-résine A-Muc-K(S)-A-PAM-PEGA « Muc(Ser)PAM-PEGA » (5) (Schéma 59). Les deux fonctions aldéhyde seront obtenues par une déprotection au TFA de l'acétal d'une part et par oxydation de la sérine par NaIO<sub>4</sub> d'autre part. La synthèse de ce synthon sera décrite en deux parties : l'élongation conduisant au peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5) et l'obtention du peptide Muc(Ser)Acétal (4) par aminolyse.

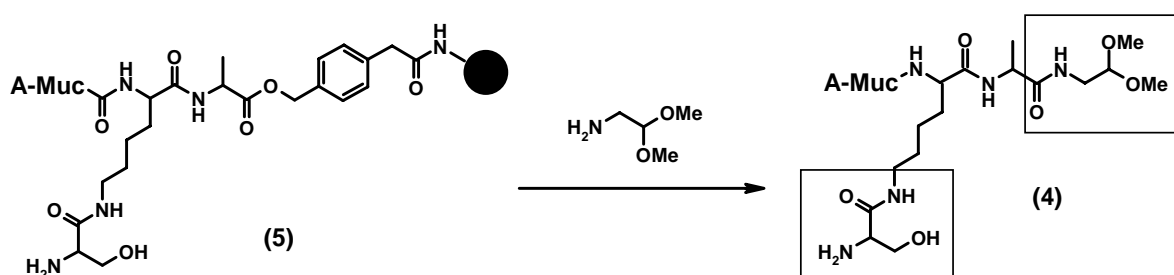


Schéma 59 : Synthèse du synthon dialdéhyde masqué Muc(Ser)Acétal (4)

## II. 3. B. Synthèse du peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5)

### II. 3. B. a. Synthèse de l'acide-amino-résine A-PAM-PEGA (6)

La première étape de la synthèse du peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5) a été la fixation de l'alanine C-terminale et du bras PAM sur la résine PEGA. Ceci a été réalisé à partir de l'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique (7) commercial et a permis d'obtenir l'acide-amino-résine protégé Boc-A-PAM-PEGA (8) (Schéma 60).

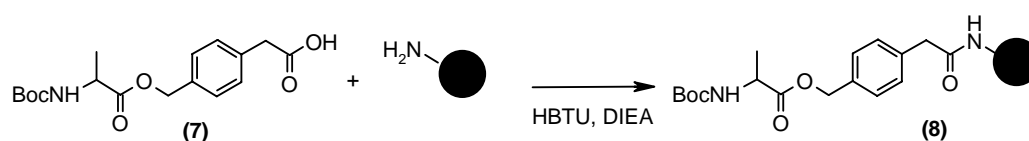


Schéma 60 : Synthèse de l'acide-amino-résine Boc-A-PAM-PEGA (8)

La résine PEGA étant aminométhylée, il s'agit de la formation d'une liaison amide. Deux protocoles décrits en synthèse peptidique ont successivement été utilisés pour ce couplage.

Suivant le protocole le plus couramment utilisé, la fonction acide du composé (7) a d'abord été préactivée par HBTU/HOBt en présence de DIEA pour former l'ester actif d'HOBt qui a ensuite été mis en présence de la résine portant la fonction amine (Schéma 61).

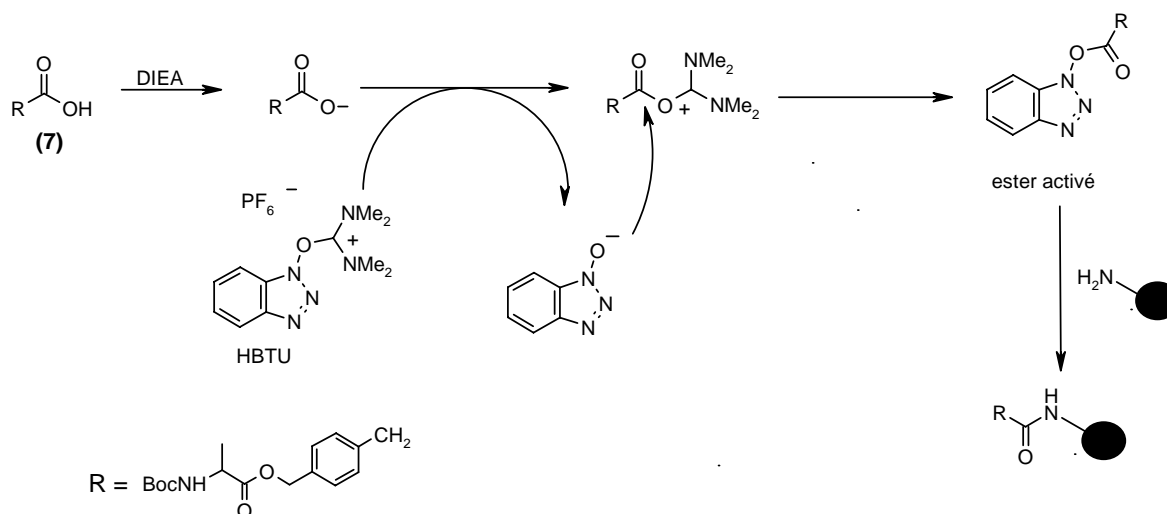
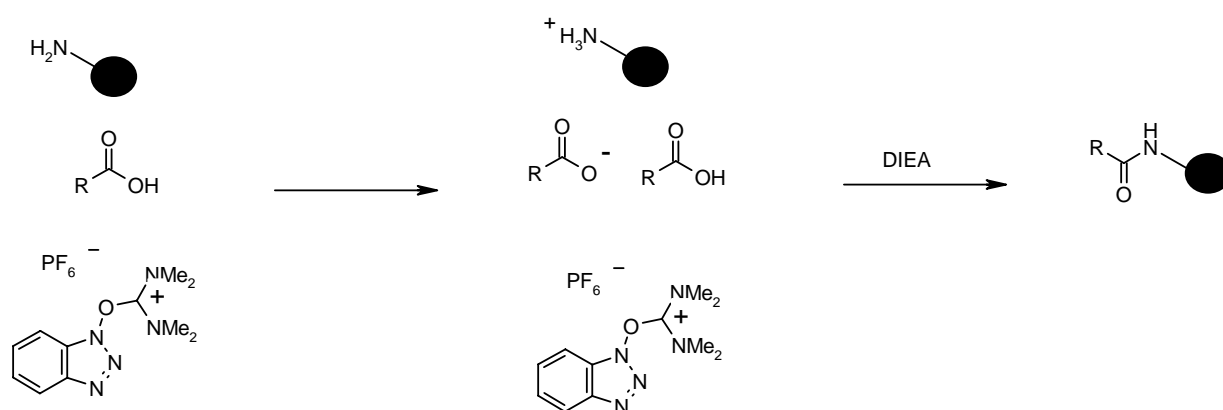


Schéma 61 : Couplage peptidique de l'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique (7) sur la résine PEGA aminométhylée avec préactivation de la fonction acide

La vérification du couplage par le test de Kaiser<sup>145</sup> a révélé un couplage incomplet. Un double couplage avec des temps de réaction plus longs permet cependant d'obtenir un couplage quasiment quantitatif.

Un deuxième protocole utilisé est le protocole de « neutralisation *in situ* » décrit pour les couplages peptidiques en stratégie Fmoc<sup>146</sup> qui s'inspire du protocole de neutralisation *in situ* décrit pour la stratégie Boc<sup>147</sup>:

Dans le cas de la stratégie Boc, la fonction amine est protonée suite à la déprotection du Boc par TFA. Une première méthode de couplage consiste à neutraliser la résine avec une base tertiaire avant d'introduire l'acide aminé sous forme d'ester activé. Une deuxième méthode consiste à neutraliser *in situ* la résine avec une base tertiaire en présence de l'acide aminé et de l'agent de couplage<sup>147</sup>. Dans le cas de la stratégie Fmoc, la méthode de « neutralisation *in situ* » consiste à introduire une étape de protonation de la résine par l'acide aminé en présence de HBTU puis, de même que dans la stratégie Boc, à neutraliser la résine *in situ* (Schéma 62).



**Schéma 62** : Couplage peptidique en stratégie Fmoc selon la méthode de neutralisation *in situ*.

Ce protocole, appliqué au couplage de l'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique (7) sur la résine PEGA aminométhylée, a conduit à un rendement quantitatif dès le premier couplage. Le Boc a ensuite été éliminé par un traitement TFA suivi de la neutralisation par DIEA pour donner l'amino-acide-résine A-PAM-PEGA (6).

### II . 3 . B . b . Elongation du peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5)

A partir de l'acide-amino-résine (6), la deuxième étape pour la préparation du peptide-résine (5) est l'élongation du peptide A-Muc-K(S). Deux stratégies (Schéma 63) sont alors possibles suivant que l'on souhaite coupler la sérine sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine avant (stratégie a) ou après (stratégie b) l'élongation du peptide A-Muc.

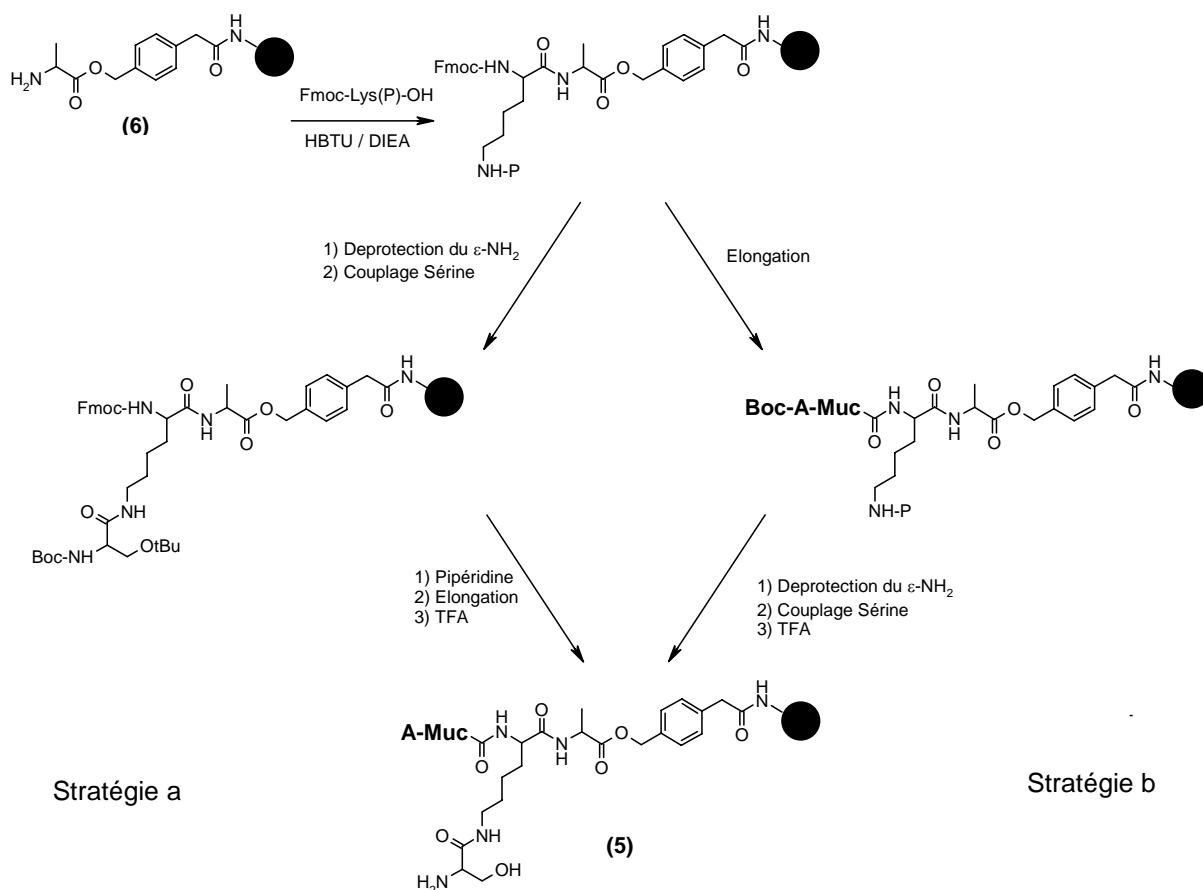


Schéma 63 : Stratégie d'élongation du peptide-résine (5)

P : groupe protecteur de la fonction  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine

Dans un premier temps nous avons envisagé d'introduire la sérine avant l'élongation (stratégie a, Schéma 63). Après le couplage de Fmoc-Lys(Boc)-OH, le Boc a été éliminé par un traitement TFA pour permettre le couplage de la sérine sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>. D'après Farrera-Sinfreu *et al.*<sup>148</sup>, la déprotection du  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> par TFA suivi de la neutralisation avec la DIEA présente un risque d'élimination prématurée du Fmoc sur le  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la lysine par attaque du  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> qui a un pKa élevé (Schéma 64).



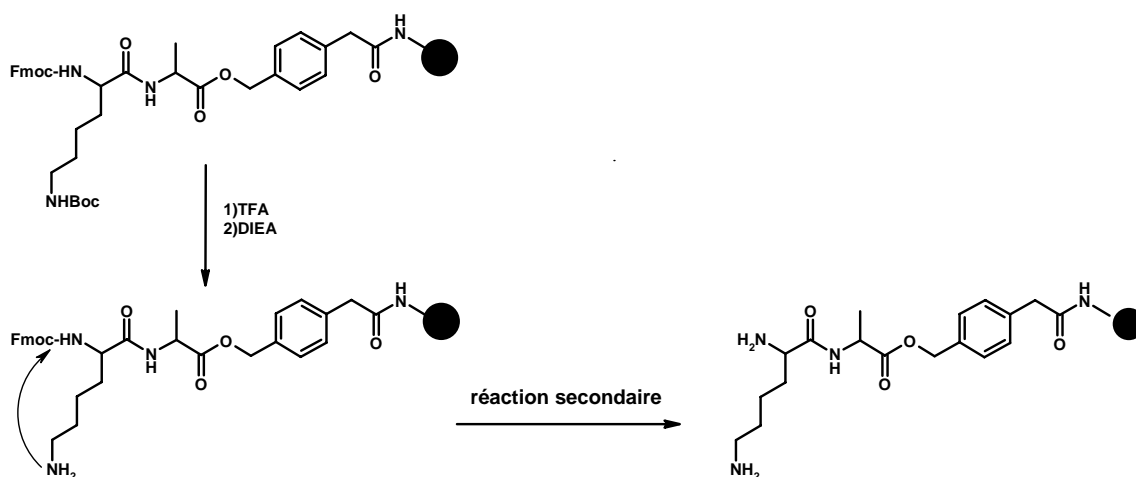


Schéma 64 : Réaction secondaire : élimination prématurée du  $N^\epsilon$ -Fmoc de la lysine par le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>

Nous avons donc suivi le protocole préconisé par ces auteurs selon lequel, après le traitement TFA, la solution d'acide aminé, de PyBOP comme agent de couplage et de DIEA est introduite sur la résine selon le protocole de neutralisation *in situ* décrit pour la stratégie Boc<sup>147</sup>. Malgré ces précautions, après le couplage de Boc-Ser(*t*Bu)-OH, l'élimination du  $N^\alpha$ -Fmoc de la lysine et la quantification de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine montre une chute de substitution de la résine, laissant penser qu'une quantité non négligeable de Fmoc a quand même été éliminée.

Face à ce problème, nous avons opté pour la seconde stratégie (stratégie b, Schéma 63) qui consiste à introduire la sérine après l'élongation. Pour cette stratégie, le choix du groupe protecteur du  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> est primordial. En effet, il doit pouvoir être déprotégé dans des conditions compatibles avec la stabilité des autres groupes protecteurs ainsi que du bras PAM.

Le groupe Dde<sup>149</sup> a d'abord été choisi. Après l'élongation du peptide en prenant soin de protéger le  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> par un Boc, le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> a été déprotégé par un traitement à l'hydrazine (2% pendant 2 minutes) pour permettre le couplage de Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH. Malgré un couplage effectif de la sérine vérifié par le test de Kaiser, le dosage UV de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine généré lors de la deprotection du Fmoc n'a révélé qu'un couplage de 50 à 70%. Nous en avons conclu que le traitement à l'hydrazine devait décrocher partiellement le peptide de la résine. En effet, le bras PAM étant sensible aux nucléophiles<sup>86</sup>, le traitement à l'hydrazine, même dans des conditions douces suffirait pour décrocher le peptide de la résine. Le groupe protecteur Dde n'est donc pas adapté.

La solution adoptée (Schéma 65) a finalement été de protéger le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine par un groupe Mtt. Après l'élongation du peptide, le Mtt a été éliminé par un traitement TFA à 1% dans le DCM, ce qui permet de maintenir l'intégrité des groupes protecteurs des chaînes latérales ainsi que du bras PAM. Toutefois la présence de TIS (2%) dans la solution de TFA est nécessaire pour éviter une retritylation<sup>150</sup>. Une attention particulière doit tout de même être portée sur la qualité du DCM qui ne doit pas contenir de trace d'HCl afin d'éviter une déprotection partielle du Boc en position N-terminale. La sérine a ensuite été couplée selon le protocole d'activation *in situ* décrit pour la stratégie Fmoc<sup>146</sup> et le Fmoc a été déprotégé par un traitement pipéridine puis dosé par spectroscopie UV. Le rendement total de ces différentes étapes (élongation et introduction de la sérine) est de 90%. Les chaînes latérales ont ensuite été déprotégées par un traitement TFA suivi de la neutralisation avec DIEA.

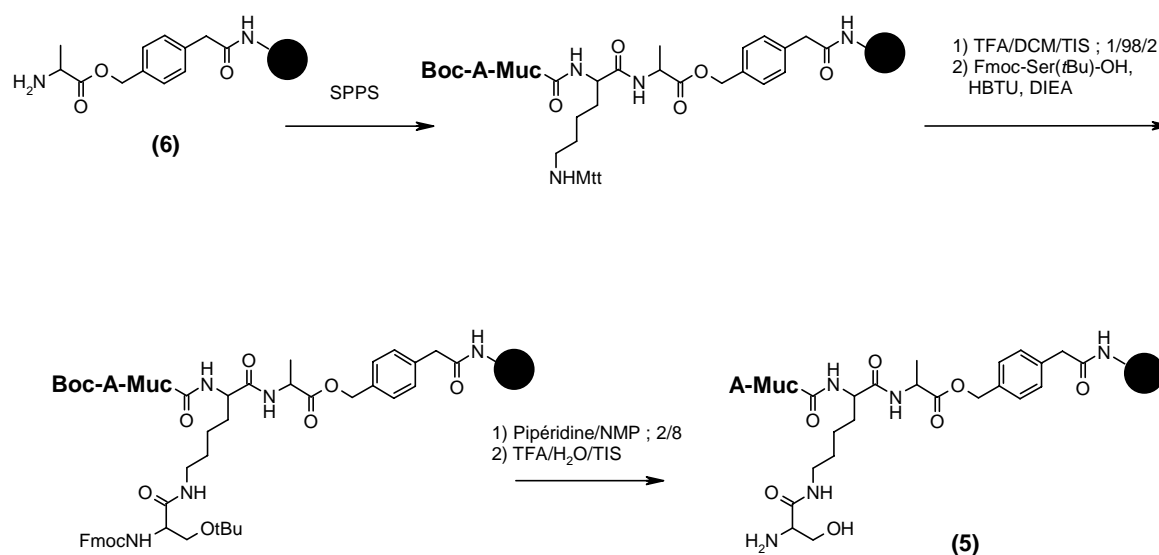


Schéma 65 : Préparation du peptide-résine (5) à partir de l'acide-amino-résine (6)

### II.3.C. Obtention du peptide dialdéhyde masqué Muc(Ser)Acétal (4) par aminolyse

L'aminolyse par l'acétaldéhyde diméthylacétal du peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5) précédemment obtenu permet d'introduire l'acétal en position C-terminale du peptide et d'obtenir ainsi le peptide (4) (Schéma 66).

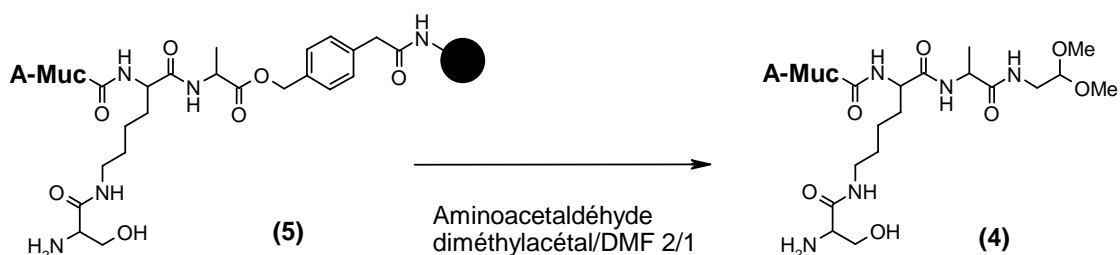


Schéma 66 : Aminolyse du peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5)

Afin de déterminer les meilleures conditions de réaction, nous avons introduit, dans un premier temps, une tyrosine en position N-terminale pour permettre de doser par spectroscopie UV le peptide obtenu. L'aminolyse réalisée avec un mélange aminoacétaldéhyde diméthylacétal / DMF ; 2 / 1 à 40 °C pendant 15h, suivie de l'extraction du peptide au DMF et à l'eau a permis d'obtenir un rendement d'environ 75%. Ces conditions jugées satisfaisantes ont donc été appliquées au peptide-résine (5).

Le profil HPLC du produit obtenu est représenté sur la figure 27. Les différents pics ont été analysés par spectrométrie de masse. En plus du pic principal correspondant au produit Muc(Ser)Acétal (4), deux produits secondaires (a) et (b) ont été observés.

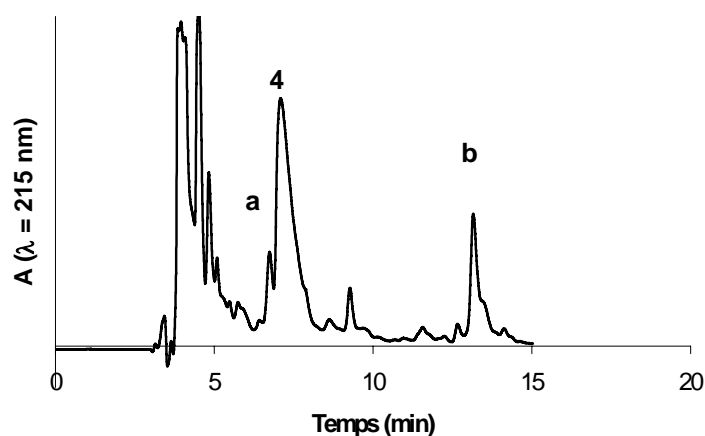


Figure 27 : Profil HPLC du produit d'aminolyse (4)

Le produit (a) représente une perte de masse de 168 Da correspondant à la perte de l'alanine et de la proline de l'extrémité N-terminale. Lors de précédents essais réalisés dans l'équipe avec la séquence Muc, l'élimination partielle des deux dernières proline avait déjà été observée. L'hypothèse de la formation d'une dicétopipérazine, favorisée par la présence de deux prolines successives, lors de l'aminolyse avait été avancée. Nous avons pensé que l'addition d'une alanine supplémentaire en position N-terminale permettrait d'éviter cette réaction secondaire. Or cette réaction persiste même si elle a lieu dans des proportions beaucoup moins importantes (jusqu'à 30% avec la séquence Muc seule). Des études complémentaires sont actuellement en cours dans l'équipe afin de résoudre définitivement ce problème.

Le produit (b) correspondant à un gain de masse de 96 Da a été attribué à un adduit TFA. Il est difficile de connaître l'origine de la formation de cet adduit, mais ce phénomène a déjà été observé par Hübener *et al.*<sup>151</sup> dans le cas d'un peptide possédant une thréonine en position N-terminale. Il semblerait que la présence de ce 2-amino-alcool favorise la formation de l'adduit TFA, celui-ci étant stabilisé par un transfert intramoléculaire de l'acyle de l'amine vers l'alcool et vice-versa (Schéma 67).

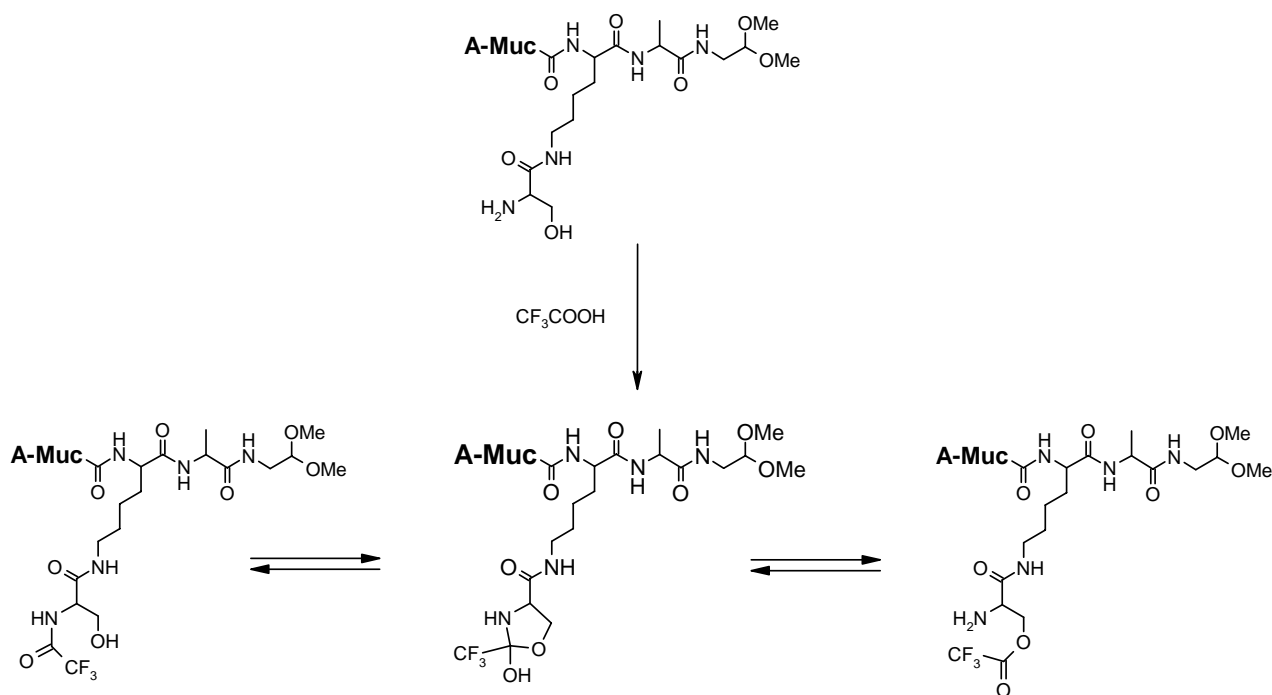


Schéma 67 : Transfert intramoléculaire du groupe trifluoroacétyl via une oxazolidine

Cet adduit a cependant facilement été éliminé par un traitement à la pipéridine<sup>152</sup>. Le produit (4) ainsi obtenu a une pureté de 75% (Figure 28). Afin de limiter le nombre d'étapes de purification par HPLC, il a été directement utilisé dans la synthèse des chimères.

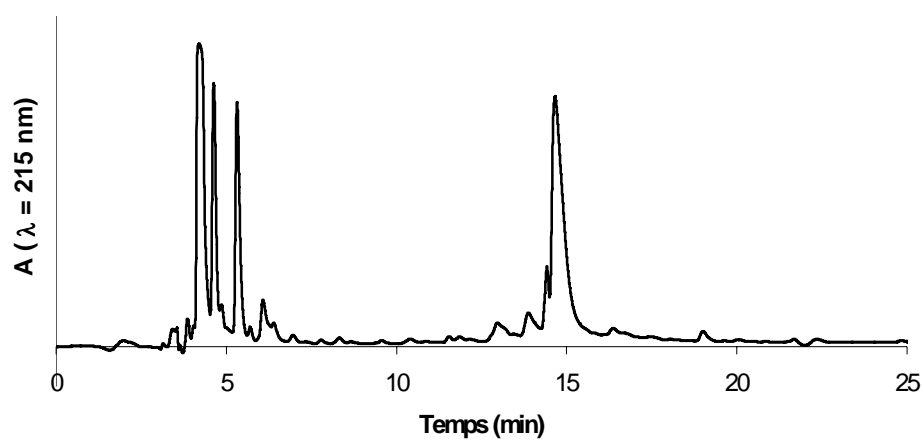


Figure 28 : Profil HPLC du synthon Muc1 dialdéhyde masqué Muc(Ser)Acétal (4)

## II. 4 . Synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)

La synthèse des trois synthons Aoa-Muc (3), Aoa-PADRE (2) et Muc(Ser)Acétal (4) étant mise au point nous pouvons maintenant aborder la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)

### II. 4 . A . Présentation de la synthèse

A partir du synthon Muc(Ser)Acétal (4) possédant deux fonctions aldéhyde potentielles, deux stratégies de synthèse sont envisageables suivant l'ordre des réactions de ligation (Schéma 68).

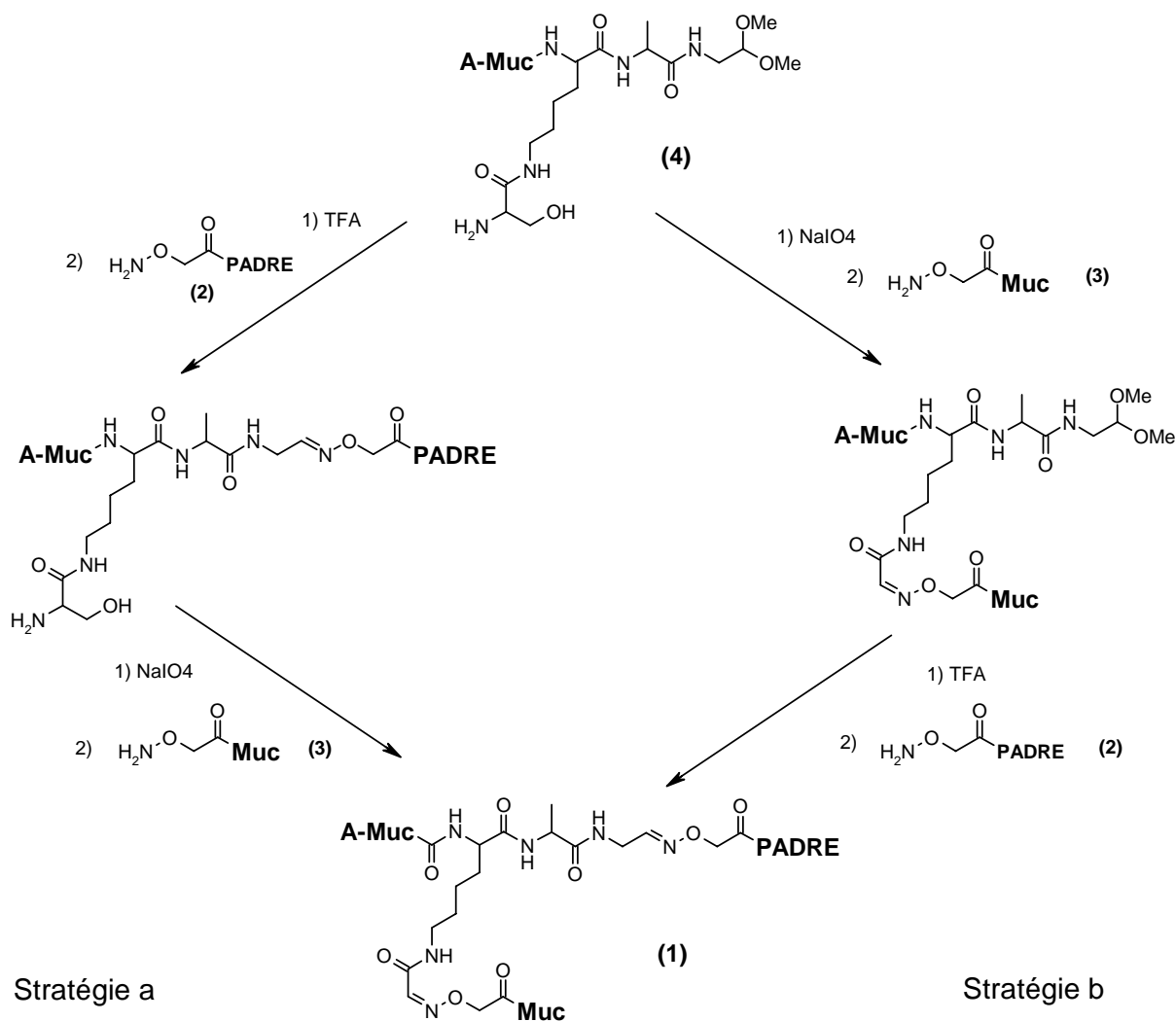


Schéma 68 : Stratégie de ligation de la chimère Muc1(Muc1)PADRE (1)

Selon la stratégie testée précédemment (stratégie a)<sup>153</sup>, la première ligation était effectuée sur le méthyl aldéhyde après déprotection de l'acétal. Suivait alors la seconde ligation sur le cétoaldéhyde après oxydation de la sérine par NaIO<sub>4</sub>. Il s'est cependant avéré que la seconde ligation sur le cétoaldéhyde, beaucoup plus lente que la ligation sur le méthylaldéhyde, était accompagnée d'une réaction de transoximation (Schéma 69).

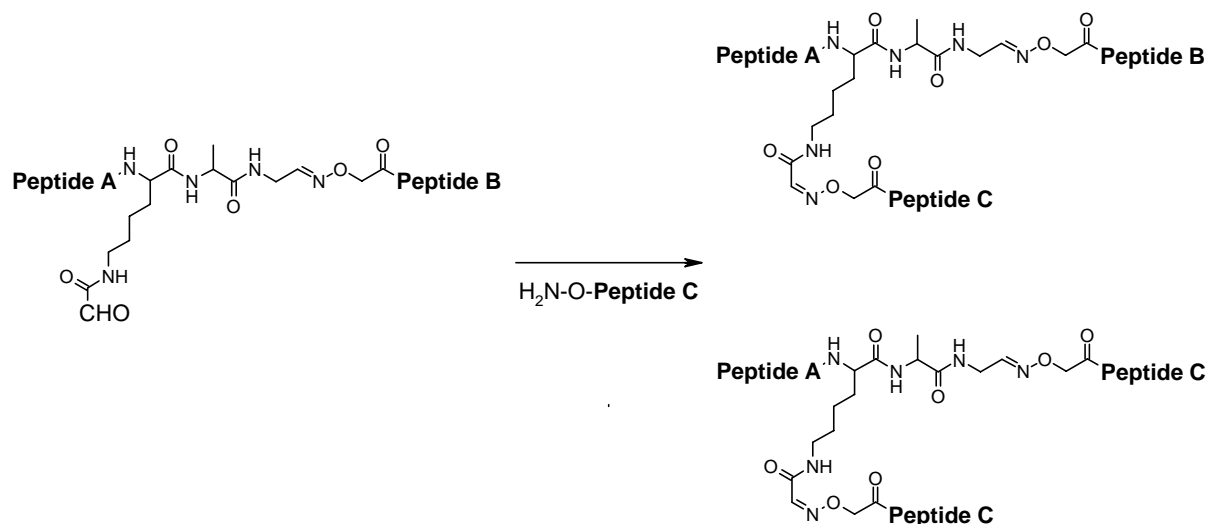


Schéma 69 : Réaction de transoximation

Afin d'éviter cette réaction secondaire nous avons choisi de réaliser la réaction la plus lente, celle sur le cétoaldéhyde, en premier. La synthèse de la chimère **1** a donc été réalisée selon le schéma suivant (schéma 70).

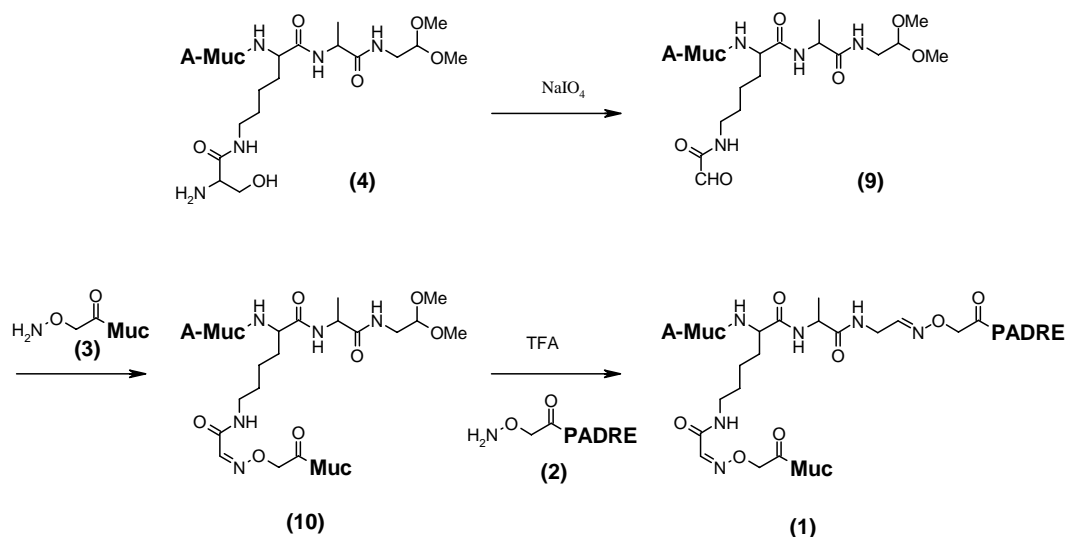


Schéma 70 : Synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)

## II. 4. B. Etude des différentes étapes de synthèse

### II. 4. B. a. Oxydation

La première étape de la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**) est l'oxydation du peptide Muc(Ser)Acétal (**4**) par  $\text{NaIO}_4$  pour former le cétoaldéhyde Muc(CHO)Acétal (**9**) (Schéma 71).

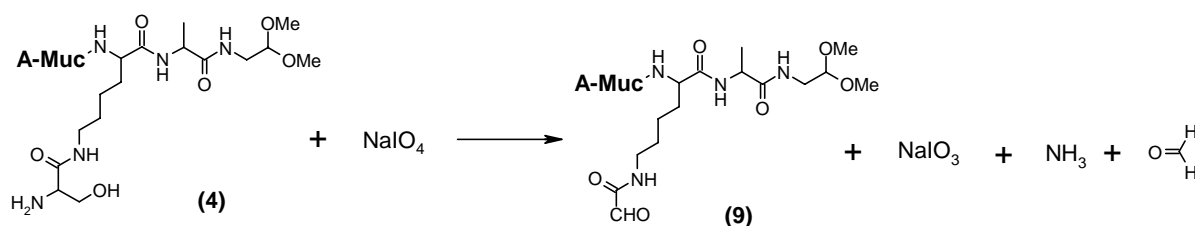


Schéma 71 : Oxydation du synthon Muc(Ser)Acétal par  $\text{NaIO}_4$

Lors de l'oxydation, du formaldéhyde est généré dans le milieu. Celui-ci pouvant réagir avec le partenaire Aoa-Muc (**3**) lors de la réaction de ligation, il est indispensable de l'éliminer. Dans un premier temps nous avons envisagé une purification par HPLC, or celle-ci s'effectue classiquement avec des solvants contenant 0,1% TFA ce qui s'est révélé être incompatible avec la stabilité de la fonction acétal, sensible en milieu acide. Malgré les précautions prises (récolter le produit dans la glace et contrôler le chauffage lors de l'évaporation des fractions), une fraction d'aldéhyde est systématiquement déprotégée lors de la purification, de l'évaporation ou même lors de la lyophilisation.

Comme la réaction d'oxydation est totale et le produit (**4**) obtenu après aminolyse est d'une pureté satisfaisante, une purification HPLC n'est pas indispensable. Nous avons donc envisagé d'éliminer le formaldéhyde par une purification beaucoup moins fine. Dans un premier temps la chromatographie d'exclusion a été testée. Selon le principe de « spin chromatographie », le peptide en solution a été déposé à la surface d'une colonne de biogel P2. Par centrifugation le peptide a été élué alors que le formaldéhyde devait rester bloqué sur la colonne. Or une fraction de formaldéhyde, suffisante pour réagir avec le partenaire Aoa-Muc (**3**) lors de la ligation, passe tout de même dans la solution avec le peptide. Finalement le peptide a été filtré sur une colonne Sep-Pak® C18. A condition d'un lavage à l'eau très abondant avant l'éluion du peptide, le formaldéhyde a ainsi pu être éliminé. Après évaporation du solvant d'éluion, le cétoaldéhyde (**9**) a été mis en solution dans un tampon acétate de sodium 0,1M pH 4,6 et a été analysé par HPLC. Au vu de la qualité du profil



obtenu (figure 28), il est tout à fait envisageable, d'engager le produit (9) ainsi obtenu dans la réaction de ligation

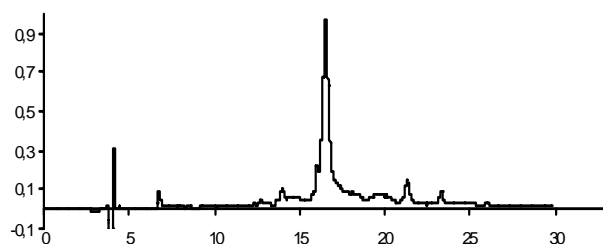
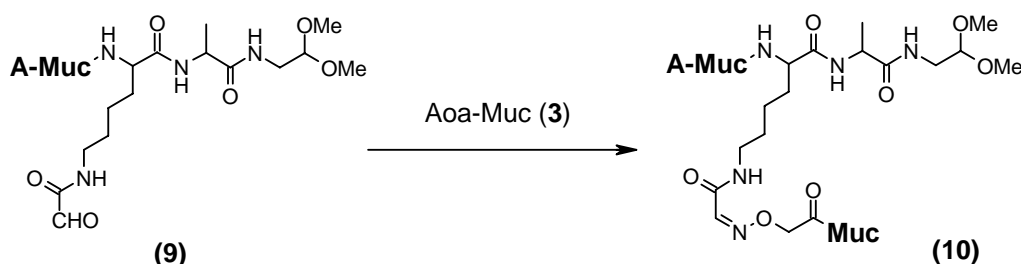


Figure 28 : Profil HPLC du Cétoaldéhyde Muc(CHO)Acétal (9)

### II.4.B.b. Ligations

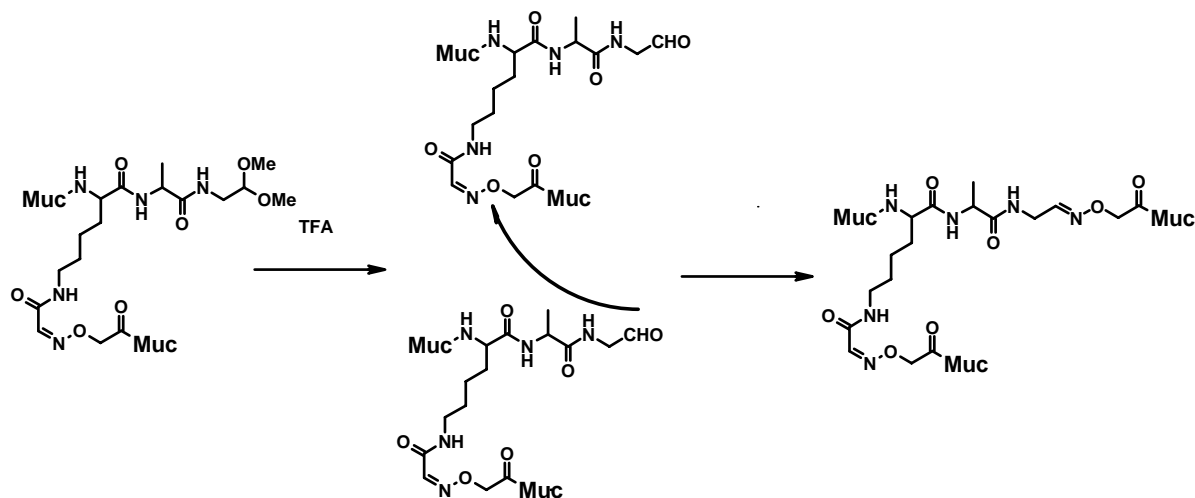
Pour réaliser la première ligation (Schéma 72), le partenaire Aoa-Muc (3) a été ajouté dans le milieu contenant le cétoaldéhyde (9) et la réaction de ligation a été suivie par HPLC. Après 20h, la réaction est complète à environ 90%.



Shéma 72 : Réaction de ligation entre le cétoaldéhyde (9) et l'Aoa-Muc (3)

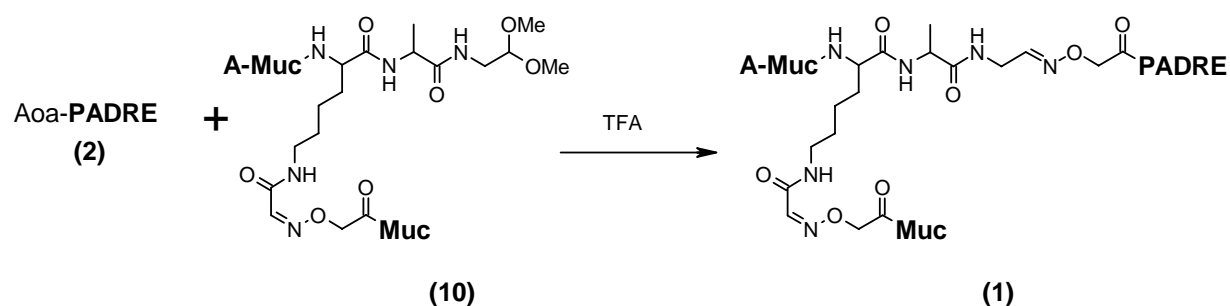
Le produit (10) Muc(Muc)Acétal ainsi obtenu a été purifié par HPLC et lyophilisé. Puis l'acétal a été déprotégé par un traitement TFA. Lors de ces différentes étapes nous avons observé l'apparition d'un produit secondaire (jusqu'à 40%) correspondant au produit Muc(Muc)Muc. Nous en avons déduit que l'aldéhyde partiellement déprotégé lors de la purification, de l'évaporation des fractions ou de la lyophilisation, réagit, du fait de la présence de TFA, sur la liaison oxime déjà existante selon une réaction de transoximation (Schéma 73). La réactivité des aldéhydes est en effet exaltée en milieu acide<sup>154</sup>. Ce type de réaction de transoximation a déjà été décrit dans ces conditions avec l'acide lévulinique<sup>155</sup> ou l'acide pyruvique dans le cas d'une liaison hydrazone<sup>156</sup>. De même un excès d'aminoxy peut

être utilisé pour hydrolyser une liaison oxime. Cette dernière réaction a d'ailleurs été mise à profit pour libérer un peptide aminoxy protégé sous forme d'oxime<sup>157</sup>.



**Schéma 73** : Réaction secondaire de transoximation en présence de TFA

Après plusieurs tentatives pour éviter cette réaction secondaire, la solution adoptée a été de récolter le produit **(10)** lors de la purification HPLC en présence du partenaire Aoa-PADRE **(2)**. Ainsi, l'aldéhyde généré lors de la purification, de l'évaporation des fractions, de la lyophilisation ou du traitement TFA, réagit immédiatement avec le partenaire aminoxy pour former *in situ* la chimère **(1)** attendue (Schéma 74).



**Schéma 74** : Déprotection *in situ* du peptide Muc(Muc)Acétal **(10)**

Après lyophilisation du produit **(10)** en présence du partenaire Aoa-PADRE **(2)**, le produit obtenu a été dissout dans l'eau. L'analyse HPLC montre bien la présence du produit **(1)** déjà partiellement formé (figure 30). Ce dernier est élué sous la forme d'un double pic qui correspond aux deux isomères *cis* et *trans* de la liaison oxime.

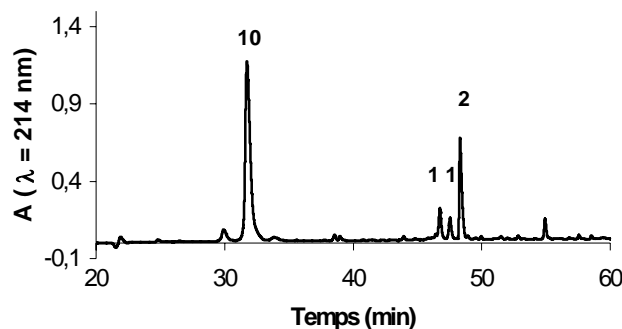


Figure 30 : Produit obtenu après lyophilisation, en présence du partenaire Aoa-PADRE (2), du produit (10) purifié

La réaction a ensuite été menée à terme par un traitement au TFA et la chimère (1) a été purifiée par HPLC sur une colonne C4 puis lyophilisée.

Après optimisation des différentes étapes de la synthèse, le rendement global est de 10%. Si l'on remplace le peptide PADRE par l'unique résidu aminooxy, le rendement obtenu est de 25%, ce qui est tout à fait satisfaisant pour cette synthèse multi-étape. Le faible rendement obtenu avec le peptide PADRE est en fait dû à l'hydrophobie de ce peptide qui entraîne une baisse importante du rendement lors de la dernière étape de purification HPLC, malgré l'utilisation d'une colonne C4 au lieu d'une colonne C18.

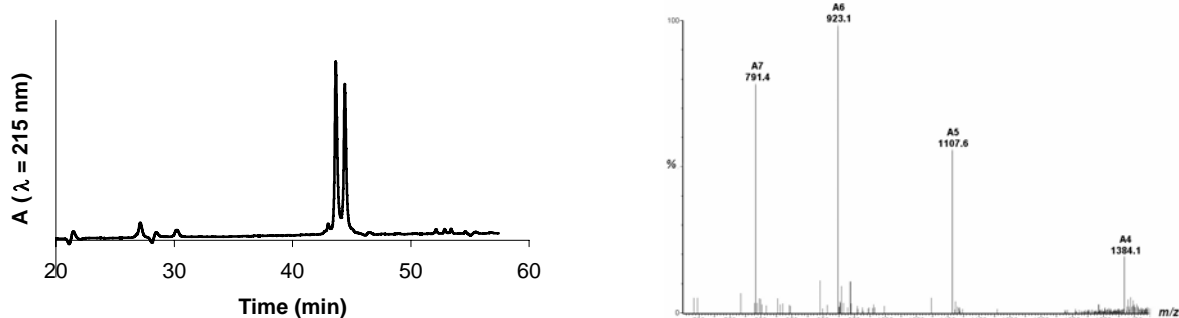


Figure 31 : Profil HPLC et spectre de masse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)

## II.5. Synthèse de nouvelles chimères pour l'étude de l'immunogénicité de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)

### II.5.A. Conception des nouvelles chimères

La synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) étant mise au point, nous avons voulu tester la capacité de cette chimère à induire une réponse immunitaire humorale. Afin de vérifier l'intérêt d'une telle construction possédant deux unités de répétition Muc en position branchée, deux autres molécules ont été synthétisées (Figure 32) :

-Une chimère monomérique MucoxPADRE (11) ne possédant qu'une unité de répétition Muc.

-Une chimère dimérique linéaire MucMucoxPADRE (12) possédant deux unités de répétition Muc en position linéaire.

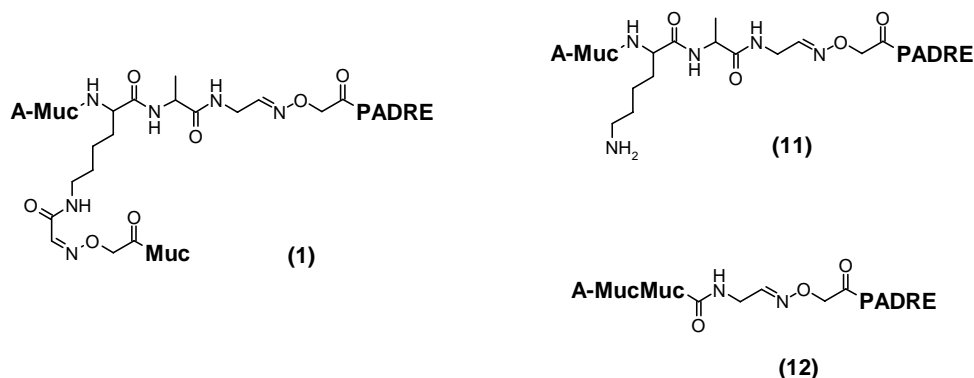


Figure 32 : Chimères Muc(Muc)PADRE (1), MucoxPADRE (11), MucMucoxPADRE (12)

Nous souhaitons également tester l'influence de l'épitope PADRE sur la réponse immunitaire. Pour cela, trois chimères Muc(Muc)oxOH (13), MucoxOH (14) et MucMucoxOH (15) de construction identique aux précédentes mais possédant un résidu Aoa seul à la place du synthon Aoa-PADRE ont été préparées (Figure 33).

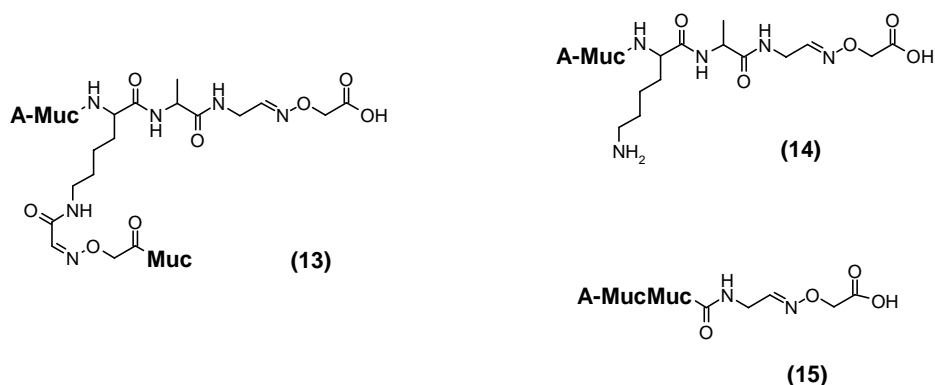


Figure 33 : Chimères Muc(Muc)oxOH (**13**), MucoxOH (**14**) et MucMucoxOH (**15**)

## II. 5. B. Synthèse des nouvelles chimères

La chimère Muc(Muc)oxOH (**13**) a été obtenue à partir du synthon Muc(Muc)Acétal (**10**) qui a été déprotégé par un traitement TFA en présence d'Aoa (Schéma 75).

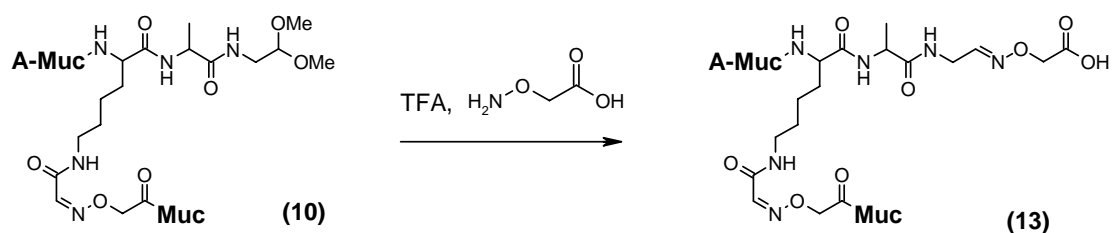


Schéma 75 : Synthèse de la chimère Muc(Muc)oxOH (**13**)

Pour la synthèse des chimères MucoxOH (**14**) et MucoxPADRE (**11**) (Schéma 76), le synthon « MucAcétal » (**16**) a tout d'abord été préparé par aminolyse du peptide-résine A-Muc-K-A-PAM-PEGA. Le synthon MucAcétal (**16**) a ensuite été déprotégé par un traitement TFA en présence d'Aoa ou du synthon Aoa-PADRE (**2**) pour conduire respectivement aux chimères (**14**) et (**11**).

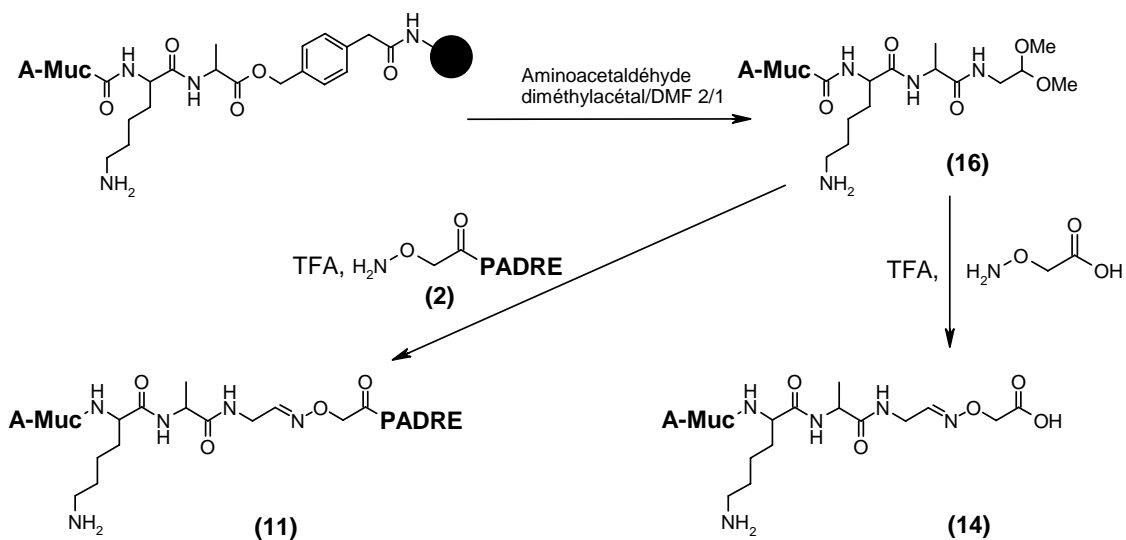


Schéma 76 : Synthèse des chimères MucoxOH (14) et MucoxPADRE (11)

Les chimères MucMucoxOH (15) et MucMucoxPADRE (12) ont été préparées de la même façon que les chimères MucoxOH (14) et MucoxPADRE (11) à partir du synthon « MucMucAcétal » (17) obtenu par aminolyse du peptide-résine A-Muc-K-A-PAM-PEGA (Schéma 77).

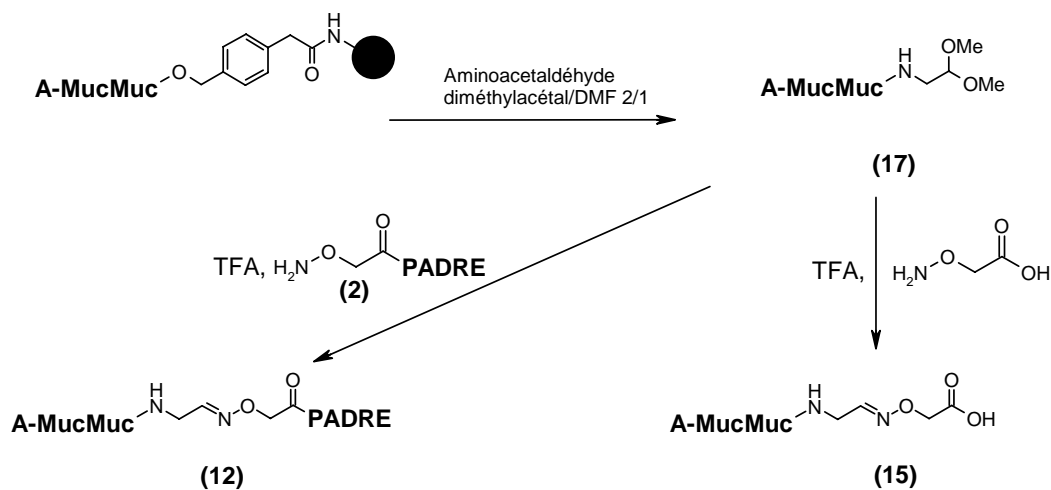


Schéma 77 : Synthèse des chimères MucMucoxOH (15) et MucMucoxPADRE (12)

## II. 6 . Etude de l'immunogénicité des chimères non glycosylées

La réponse immunitaire humorale induite par les chimères Muc(Muc)PADRE (1), MucOXPADRE (11), MucMucOXPADRE (12), Muc(Muc)oxOH (13), MucOXOH (14) et MucMucOXOH (15) (Figure 33 bis) a été déterminée dans un modèle murin. Les produits ont été injectés par voie sous-cutanée dans des lignées consanguines de souris (C57 Bl6) de même sexe et de même âge, 3 souris par lots, avec l'adjuvant incomplet de Freund. Après deux rappels à 15 jours d'intervalle, les anticorps induits ont été titrés par Elisa (Enzym Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigène immobilisé sur la plaque de microtitration est la protéine recombinante Muc8 possédant huit unités de répétition Muc.

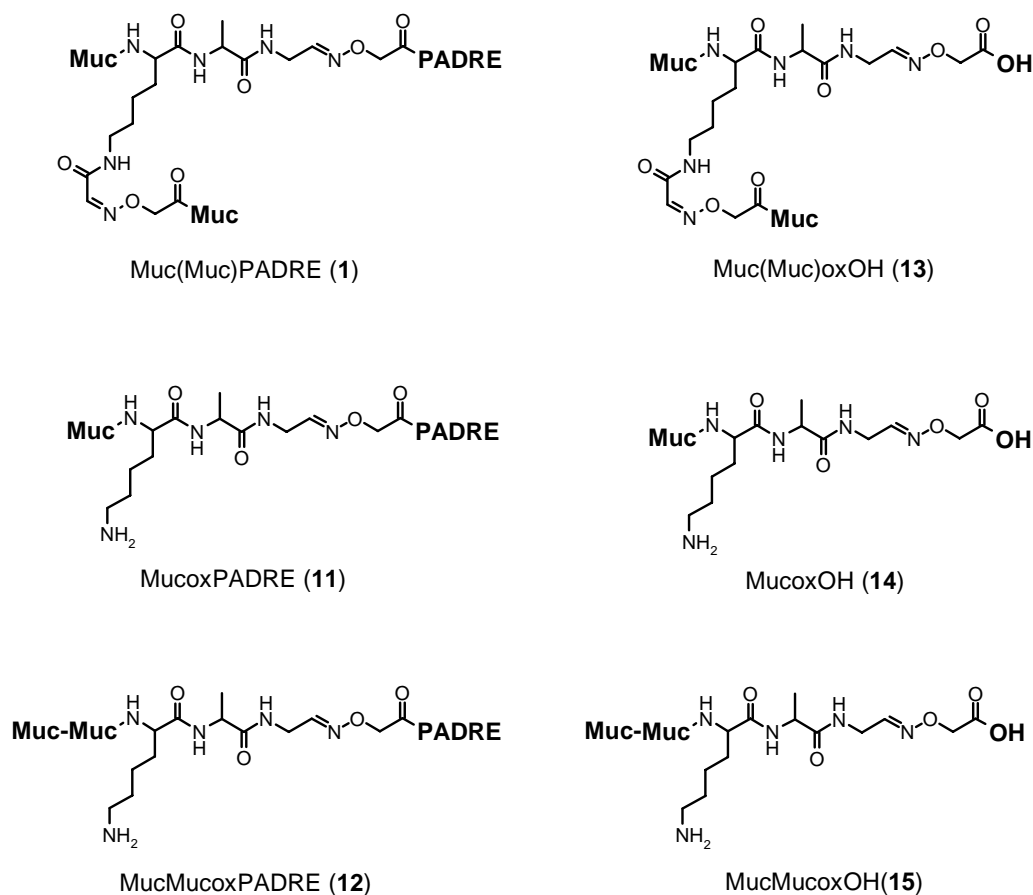
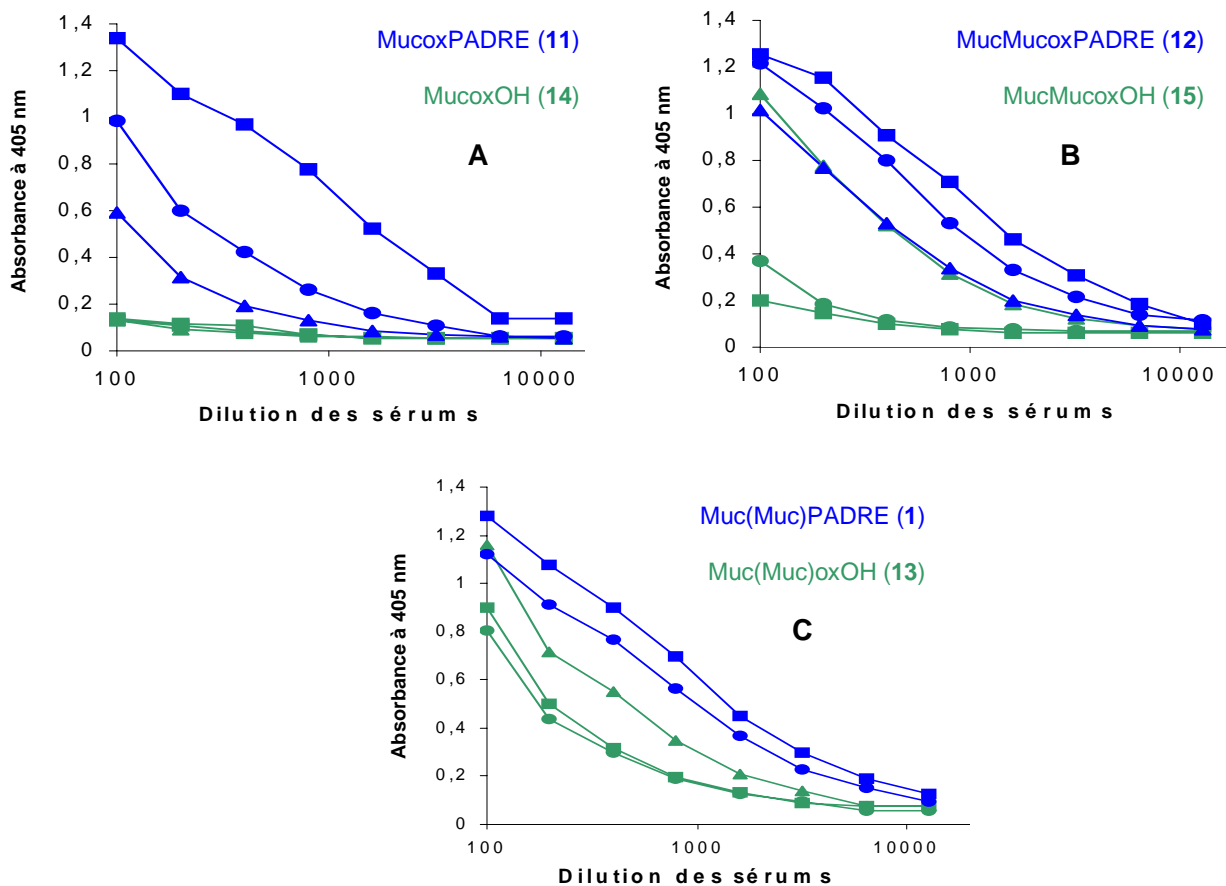


Figure 33 bis : Chimères utilisées pour les essais d'immunisation

Les trois graphes de la figure 34 permettent de comparer, pour chacun des types de construction, l'immunogénicité des chimères possédant ou non l'épitope PADRE.



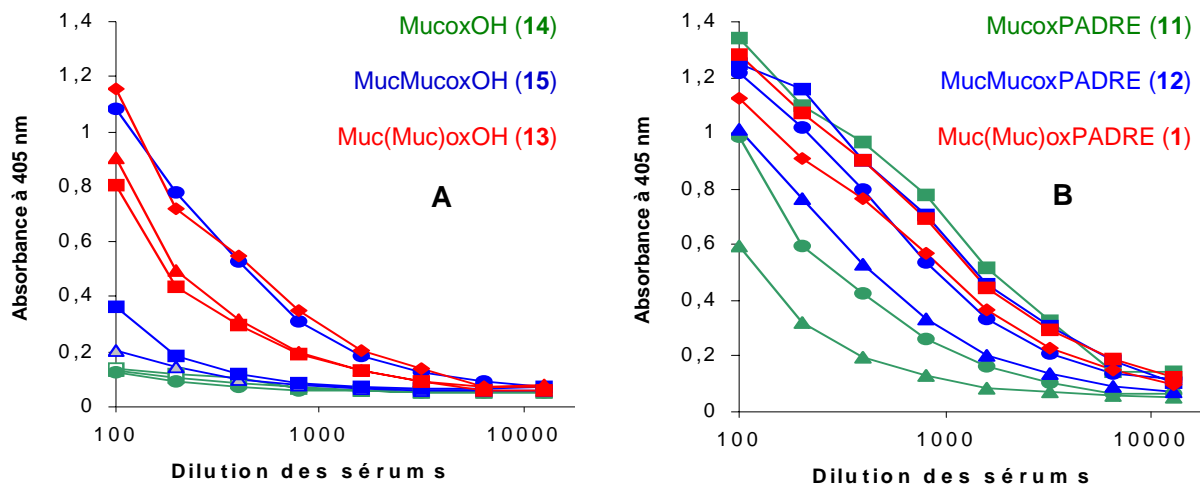
**Figure 34 :** Influence de l'épitope PADRE sur l'immunogénicité des chimères monomériques (A), dimériques linéaires (B) et branchées (C)

Les souris ont été immunisées trois fois à 15 jours d'intervalle en sous-cutané avec 100  $\mu$ g de peptide dans l'adjuvant incomplet de Freund. Les sérums ont été prélevés 15 jours après le dernier rappel. Les anticorps anti-Muc8 ont été révélés par un anticorps de chèvre anti-Ig de souris couplé à la peroxydase. Pour chacune des chimères sont représentés les résultats obtenus avec chaque souris.

Hormis pour une seule souris immunisée avec l'immunogène MucMucoxOH (15) (Figure 34B) qui montre une réponse étonnement élevée, ces résultats montrent sans ambiguïté l'utilité de l'introduction du peptide PADRE dans les immunogènes. Celui-ci permet en effet d'augmenter la production d'anticorps quel que soit le type de construction des immunogènes.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les différents types de construction indépendamment du rôle du PADRE, nous avons regroupé dans la figure 35, d'un côté les résultats obtenus avec les immunogènes ne possédant pas l'épitope PADRE (Figure 35A) et de l'autre ceux obtenus avec les immunogènes possédant l'épitope PADRE (Figure 35B).





**Figure 35 :** Comparaison de l'immunogénicité des chimères monomériques, dimériques linéaires ou branchées dans le cas des immunogènes avec (A) ou sans l'épitope PADRE (B)

En ce qui concerne les immunogènes ne possédant pas le peptide PADRE (Figure 35A), mis à part la souris montrant une réponse étonnamment élevée avec l'immunogène MucMucoxOH (15), l'addition d'une unité Muc en position linéaire permet d'augmenter légèrement la production d'anticorps par rapport à la chimère monomérique, celle-ci restant de très faible intensité. La réponse est par contre nettement amplifiée dans le cas de la chimère (13) où la deuxième unité Muc est introduite en position branchée.

L'augmentation de l'immunogénicité induite par une présentation branchée a déjà été montrée par Jackson et ses collaborateurs dans le cas d'immunogènes contenant des épitopes B et T<sup>158</sup>. Ce qui est ici intéressant est l'immunogénicité de cette chimère branchée Muc(Muc)OH (13) malgré l'absence d'épitope T. En plus de la géométrie branchée, cette augmentation de l'immunogénicité pourrait être due à la deuxième liaison oxime ayant permis la fixation de la deuxième unité Muc en position branchée. Il serait également intéressant de connaître l'influence de l'orientation de cette deuxième unité Muc. De précédentes études ont en effet déjà montré l'effet de l'orientation d'épitopes B, fixés à une protéine porteuse<sup>159</sup> ou présentés sous forme de MAP<sup>160</sup>, sur l'immunogénicité ou la sélectivité des anticorps produits. Dans notre cas, la deuxième unité Muc en position branchée est fixée par son extrémité N-terminale et possède donc une extrémité C-terminale libre alors que dans le dimère linéaire, celui-ci est fixé par son extrémité C-terminale.

De façon surprenante, lorsqu'on compare entre elles les chimères possédant l'épitope PADRE (Figure 35B), la géométrie de la chimère semble avoir moins d'influence. La réponse

détectée chez les souris immunisées avec les chimères MucMucoxPADRE (12) ou Muc(Muc)PADRE (1) semble en effet de même intensité. Du fait de l'hétérogénéité des résultats obtenus pour les différentes souris d'un même lot, ce résultat reste à confirmer.

De plus, ce type d'observation avait déjà été fait par Rose et ses collaborateurs<sup>161</sup> lors de la comparaison de l'immunogénicité d'un peptide issu du virus de la grippe présenté sous différentes formes. Dans cette étude, ils ont montré que ce peptide monomérique auquel est couplé le Pam3Cys (tripalmityl-S-glyceryl cystéine) comme adjuvant est aussi immunogène, à une certaine concentration, que le peptide présenté sous forme de tétraoxime couplé au Pam3Cys. Par contre lorsque la quantité d'immunogène administré aux souris est diminuée, le peptide présenté sous forme de tétraoxime est plus immunogène que le peptide monomérique. Dans notre cas, il serait donc intéressant de recommencer ces essais d'immunisation en diminuant les quantités d'immunogènes injectées aux souris. D'autre part, du fait de l'hétérogénéité des résultats obtenus pour les différentes souris, ces essais doivent être réalisés sur des lots plus importants.

Ces résultats préliminaires d'immunisation avec des chimères non glycosylées sont donc encourageants ; même si certaines questions demandant des expériences supplémentaires ont été soulevées, ils montrent l'intérêt de synthétiser de telles chimères de construction branchée et contenant l'épitope PADRE.

## **II. 7. Conclusion**

Nous avons réussi à mettre au point la synthèse d'une petite protéine modulaire Muc(Muc)PADRE (1). Nous avons également pu montrer le potentiel immunogène d'une telle construction.

De façon plus générale, cette stratégie de synthèse permet d'assembler par des liaisons oxime trois différents peptides selon une présentation branchée. Grâce à l'aspect modulaire de cette synthèse nous pouvons maintenant imaginer d'autres chimères présentant les mêmes épitopes dans un ordre différent ou présentant d'autres épitopes. Ces chimères pourront ensuite être testées afin de déterminer les meilleurs immunogènes.

La suite de ce travail de thèse consiste à appliquer cette stratégie à la synthèse de chimères glycosylées qui sont *a priori* dans le cas de MUC1 des immunogènes plus spécifiques.

### **III . Synthèse des chimères glycosylées**

Les premiers résultats d'immunisation sur les chimères non glycosylées étant encourageants, nous avons souhaité introduire dans nos constructions des épitopes saccharidiques spécifiques de la mucine tumorale (épitope T (GalNAc) et Tn (GalGalNAc)). En effet, ceci devrait permettre une meilleure spécificité des anticorps produits vis-à-vis des cellules tumorales<sup>36, 37</sup>. Des essais préliminaires de glycosylation enzymatique sur les précédentes chimères ayant montré une glycosylation non homogène, nous avons choisi d'introduire la partie saccharidique par voie chimique. Nous souhaitons en particulier introduire les déterminants saccharidiques sur le domaine immunodominant A<sup>9</sup>PDTR<sup>13</sup>.

#### **III . 1 . Stratégie de synthèse**

La synthèse de chimères glycosylées par voie chimique a été effectuée en collaboration avec l'équipe du professeur Kunz de l' « Institut de Chimie Organique » de Mayence (Allemagne). La stratégie développée a permis de conjuguer les savoir-faire de nos deux équipes qui sont la synthèse de glycopeptides d'un côté et la synthèse de petites protéines modulaires de l'autre.

L'approche utilisée par Kunz et ses collaborateurs pour la synthèse de glycopeptides vise à introduire lors de l'élongation d'un peptide un synthon Fmoc-Thr/Ser-OH glycosylé dont les fonctions alcool sont protégées par des fonctions acétyles<sup>30a</sup>. Nous avons souhaité appliquer cette méthode à la synthèse de chimères glycosylées en insérant, lors de la préparation des synthons nécessaires à la synthèse des chimères, une thréonine glycosylée à la place de la thréonine 12 de la séquence Muc.

La synthèse développée précédemment nous a permis d'assembler dans une même construction deux synthons aminoxy et un synthon dialdéhyde masqué. Pour la synthèse de chimères glycosylées, se pose la question de savoir dans le ou lesquels de ces synthons pourra être introduit une thréonine glycosylée. L'insertion d'une thréonine glycosylée dans la séquence Muc lors de la préparation d'un synthon Muc dialdéhyde masqué semble problématique pour deux raisons. D'une part, la préparation d'un synthon Muc aldéhyde demande un nombre plus important d'étapes avec une perte inévitable de rendement ce qui oblige à utiliser une quantité plus importante de peptide glycosylé et donc d'acide aminé

glycosylé qui est un produit précieux. D'autre part, l'étape d'oxydation par  $\text{NaIO}_4$  ne semble pas compatible avec la présence des fonctions alcool du saccharide. La synthèse de synthons Aoa-Muc glycosylés semble par contre plus facilement envisageable.

Nous avons donc choisi de synthétiser des chimères PADRE(Muc)Muc glycosylées qui nécessitent la préparation des synthons PADRE dialdéhyde masqué et Aoa-Muc glycosylés (Figure 36)

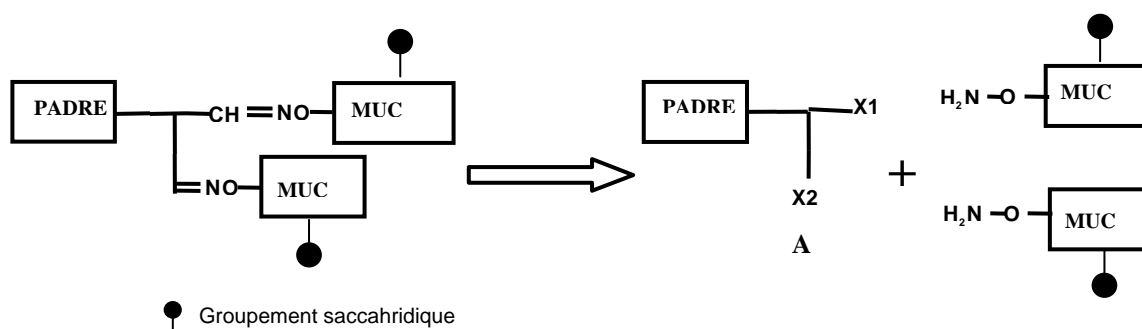


Figure 36 : Schéma rétrosynthétique des chimères PADRE(Muc)Muc.  
X1,2 : fonctions aldéhydes masquées de façon orthogonale

Cette stratégie nous amène à nous interroger sur le moment le plus opportun pour déacétyler la partie saccharidique, protégée lors de l'élongation des glycopeptides aminooxy. Cette étape s'effectuant par méthanolyse en milieu basique, il semble préférable de déacétyler ces glycopeptides avant les réactions de ligation du fait de la potentielle instabilité des liaisons oxime dans ces conditions. Ceci demande cependant de vérifier que la présence du résidu Aoa est compatible avec un tel traitement.

Il faudra également nous assurer de la stabilité de la liaison *O*-glycosidique lors du traitement TFA nécessaire, après la première ligation, pour déprotéger l'acétal. En effet, cette liaison est beaucoup plus fragile lorsque la partie saccharidique est déprotégée.

## III. 2 . Synthèse de peptide Aoa-Muc glycosylés

### III. 2 . A . Principe de la synthèse

Deux glycopeptides Aoa-MucTn (**18**) et AoaMucT (**19**) portant respectivement les épitope Tn (GalNAc) et T (Gal( $\beta_1 \rightarrow 3$ )GalNAc) ont été synthétisés (Figure 37).

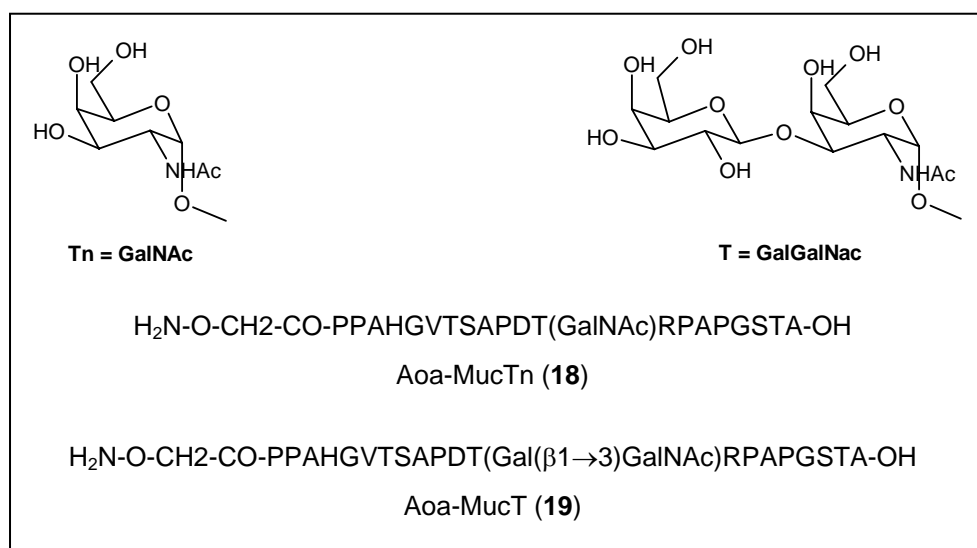
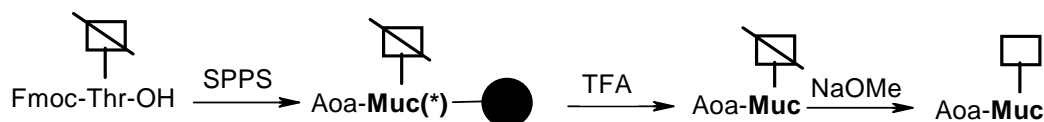


Figure 37 : Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**)

Pour la synthèse des glycopeptides Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**) (Schéma 78), les synthons Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**20**) et Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta_1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**) préalablement synthétisés ont été introduits dans la séquence Muc lors de l'élongation à la place de la thréonine 12. Les glycopeptides acétylés (**22**) et (**23**) obtenus après déprotection des chaînes latérales et coupure de la résine, ont ensuite été déprotégés par le méthanolate de sodium.



Muc (\*) Peptide Muc1 protégé sur les chaînes latérales



Ac<sub>4</sub>GalNAc (**22**) ou Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta_1 \rightarrow 3$ )Ac<sub>2</sub>GalNAc(**23**)



GalNAc (**18**) ou Gal( $\beta_1 \rightarrow 3$ )GalNAc (**19**)

Schéma 78 : Synthèse des glycopeptides Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**)

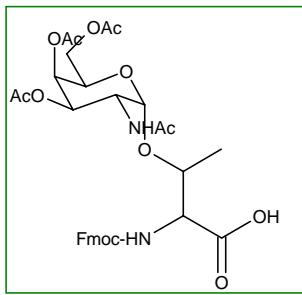
### **III. 2. B. Synthèse des synthons Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20) et Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (21)**

Ces synthons ont été réalisés lors d'un séjour de trois mois dans le laboratoire du professeur Kunz de l'institut de chimie organique de Mayence (Allemagne).

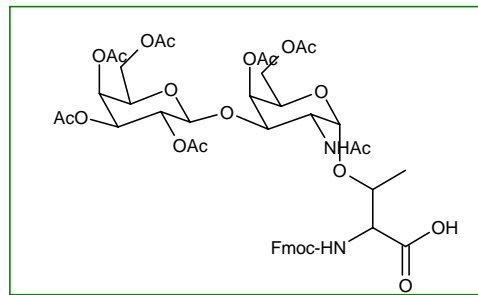
#### **III. 2. B. a. Schéma rétrosynthétique**

Les premières étapes de synthèse du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**20**) (Schéma 79), qui sont également communes à la synthèse du synthon Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**), consiste à préparer le composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**). Il est obtenu suite à la glycosylation de la thréonine protégée Fmoc-Thr-OtBu (**25**) par le bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (**26**) issu lui-même du galactose, suivie de la réduction de la fonction azido. A partir de ce composé, le synthon (Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**20**) est aisément obtenu en déprotégeant la fonction acide de la thréonine.

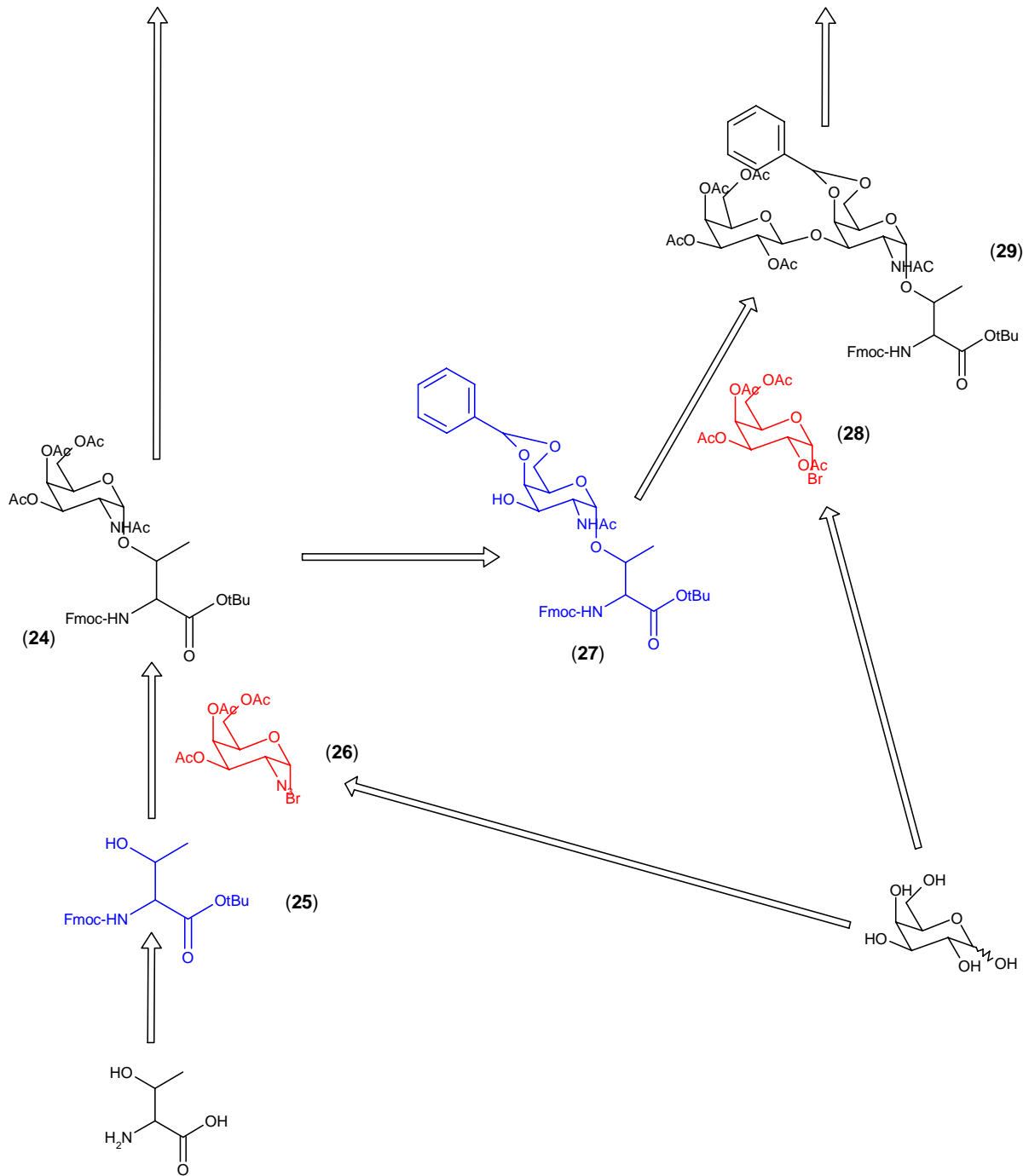
Pour la synthèse du synthon Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**) le composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**) doit être transformé en substrat accepteur Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**27**) pour pouvoir être glycosylé par le bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**). Le produit (**29**) ainsi obtenu doit ensuite subir une succession d'étapes de protection et de déprotection pour former le produit final.



**Synthon Fmoc-Thr(GalNAc)-OH (20)**



**Synthon Fmoc-Thr(GalGalNAc)-OH (21)**



**Schéma 79 : Schéma rétrosynthétique des synthons (20) et (21)**

### III . 2 . B . b . Synthèse du synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20)

#### *III . 2 . B . b . i . Synthèse de l'accepteur Fmoc-Thr-OtBu (25)*

Pour pouvoir être glycosylée, la thréonine a été protégée sur ses fonctions acide et amine (Schéma 80). Un groupement Fmoc a d'abord été introduit sur la fonction amine par réaction avec Fmoc-OSu en milieu basique<sup>162</sup>. Un groupement *t*Bu a ensuite été introduit sur la fonction acide par réaction avec le *tert.*-butanol en présence de DCC et de CuCl. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé Fmoc-Thr-OtBu (**25**) a été obtenu avec un rendement global de 63%.

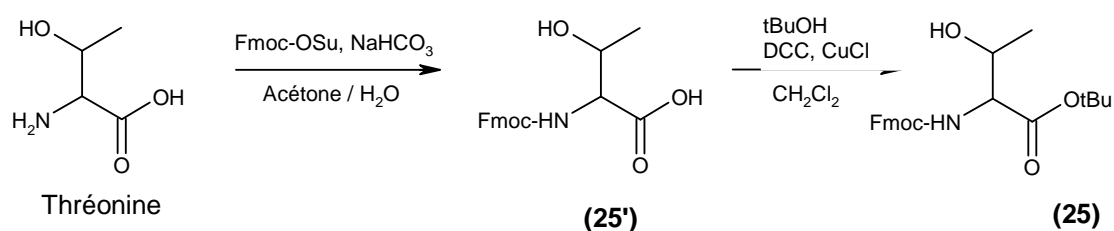


Schéma 80 : Synthèse du composé Fmoc-Thr-OtBu (**25**)

#### *III . 2 . B . b . ii . Synthèse du bromure de galactosyle $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN3-Br (26)*

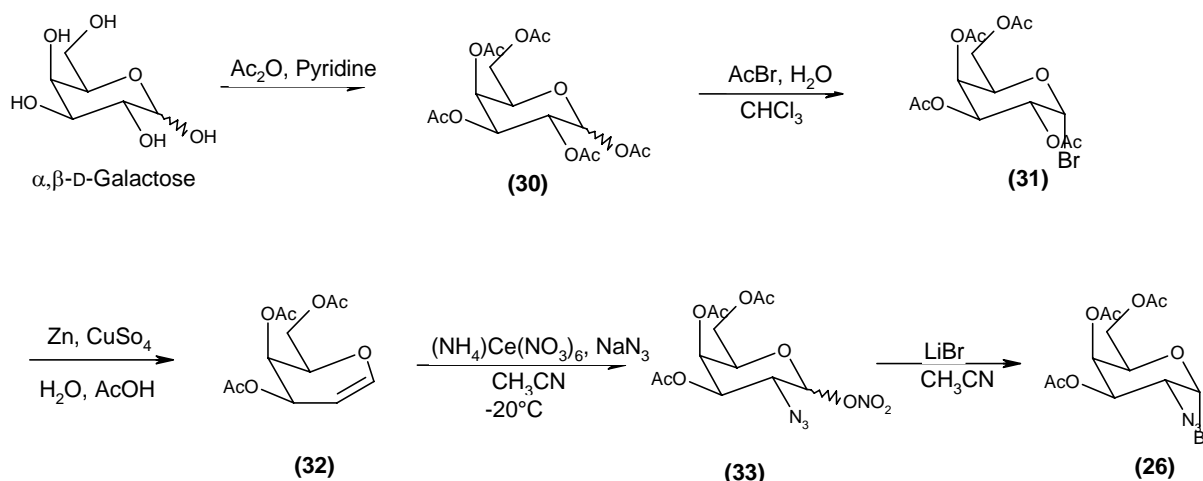
La synthèse du bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN3-Br (**26**) est relativement longue (schéma 81).

Les premières étapes de cette synthèse ont consisté à préparer l'Ac<sub>3</sub>Galactal (**32**) à partir de l' $\alpha,\beta$ -D-Galactose. Ce dernier a d'abord été acétylé par l'anhydride acétique en présence de pyridine puis converti en  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**31**) par traitement avec AcBr en présence d'eau. Du fait des effets anomères, l'anomère  $\alpha$  est le principal produit formé. L' $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**31**) non isolé a ensuite subi une élimination réductrice par Zn en milieu aqueux acide<sup>163</sup>. L'Ac<sub>3</sub>Galactal (**32**), obtenu avec un rendement de 77% pour l'ensemble de ces 3 étapes, a été directement engagé dans les réactions suivantes sans purification.

A partir de l'Ac<sub>3</sub>Galactal (**32**), le groupe nitrate et la fonction azoture ont été introduits respectivement en position 1 et 2 par une réaction d'azidonitration par (NH<sub>4</sub>)Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> et NaN<sub>3</sub><sup>164</sup>. L' $\alpha,\beta$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-ONO<sub>2</sub> (**33**) a été purifié par chromatographie avec un rendement de 37%. Ce faible rendement est, en particulier, dû à l'hydrolyse du groupe nitrate sur la colonne de silice lors de la purification.



Une substitution nucléophile du groupe nitrate par LiBr a ensuite permis d'accéder au bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (**26**)<sup>165</sup>. De même que précédemment, l'anomère  $\alpha$  est le principal produit formé. Ce composé étant particulièrement instable, il a été immédiatement utilisé pour la réaction de glycosylation sans aucune purification.



### III . 2 . B . b . iii . Synthèse du composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**)

La glycosylation de la thréonine protégée Fmoc-Thr-OtBu (**25**) par le bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (**26**) (Schéma 82) a été effectuée suivant la méthode développée par Paulsen et Hölck<sup>166</sup> selon laquelle le bromure est activé par le Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et AgClO<sub>4</sub>. Le donneur de glycosyle  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (**26**) ne possédant pas de groupe participant, l'anomère  $\alpha$  se forme préférentiellement lors de la glycosylation du fait des effets anomères. Toutefois une quantité moindre d'anomère  $\beta$  est également formée. Celui-ci a été éliminé lors de la purification par chromatographie. Ceci explique en partie le faible rendement de la glycosylation (37%).

Afin d'obtenir le composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**), la fonction azoture du composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu (**34**) a été réduite par Zn en présence d'acide et acétylée *in situ* par Ac<sub>2</sub>O<sup>167</sup>. Le composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**) a ainsi été obtenu avec un rendement de 57% après purification par chromatographie.

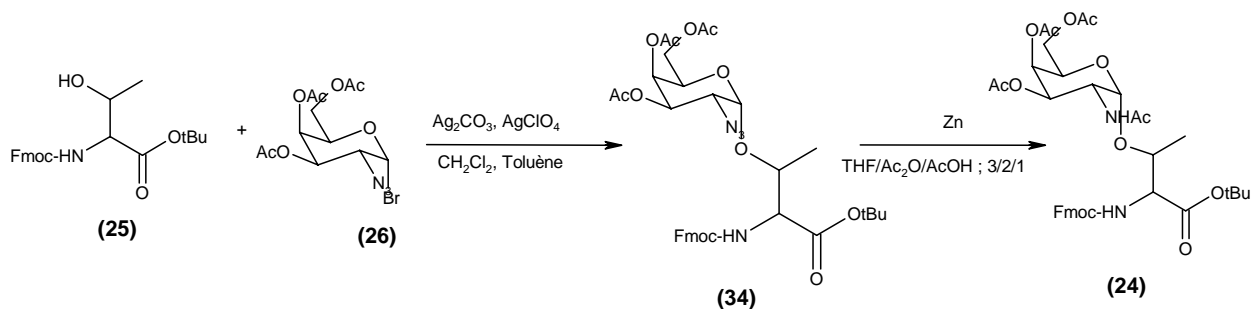


Schéma 82 : Glycosylation de la thréonine Fmoc-Thr-OtBu (25) par  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNA<sub>3</sub>-Br (26)

### III . 2 . B . b . iv . Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20)

La fonction acide du composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (24) a facilement été déprotégée par TFA en présence d'anisole (Schéma 83) avec un rendement quantitatif.

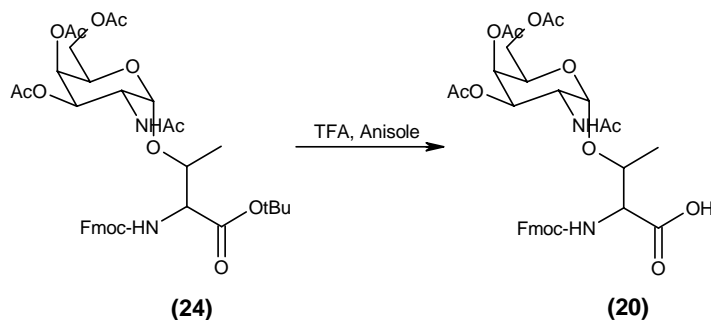


Schéma 83 : Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20)

Le synthon Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20) peut maintenant être utilisé pour l'élongation des peptides.

### III . 2 . B . c . Synthèse du synthon Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (21)

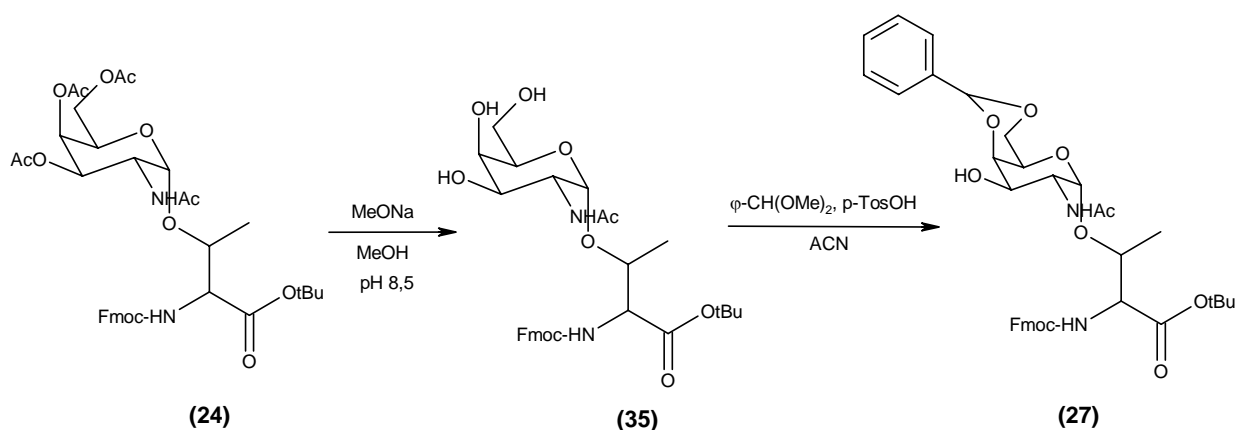
#### III . 2 . B . c . i . Préparation de l'accepteur Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (27)

Afin de pouvoir être glycosylée, la fonction alcool en position 3 du composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (24) doit être libérée et celles en position 4 et 6 spécifiquement protégées. Ceci a été réalisé en deux étapes (Schéma 84).

Dans un premier temps les trois groupements acétyle ont été éliminés suivant les conditions de Zemplén par transestérification par le méthanolate de sodium<sup>168</sup>. La difficulté de la réaction réside dans la labilité du groupement protecteur Fmoc en milieu basique. Le pH

a donc été attentivement contrôlé (pH 8,5). Malgré les précautions prises, une faible quantité de Fmoc a inévitablement été déprotégée.

Les fonctions alcool en positions 4 et 6 du composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -GalNAc)-OtBu (**35**) obtenu ont ensuite été spécifiquement protégées sous forme d'acétal par réaction avec le benzaldéhyde diméthylacétal en milieu acide <sup>169</sup>. Après purification par chromatographie le composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**27**) a été obtenu avec un rendement de 50 % sur les deux étapes.



**Schéma 84** : Préparation de l'accepteur Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**27**)

### III . 2 . B . c . ii . Préparation du bromure de galactosyle $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**)

La synthèse de l' $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**) est une des étapes intermédiaires de la synthèse de l' $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (**26**) (Schéma 81). Toutefois, dans cette précédente synthèse il n'avait pas été isolé. Un autre procédé (Schéma 85) a donc été ici utilisé pour pouvoir isoler ce produit avec une bonne pureté.

Le  $\alpha,\beta$ -D-galactose a d'abord été acétylé par Ac<sub>2</sub>O en milieu basique. Après recristallisation le  $\beta$ -Ac<sub>5</sub>-D-galactose (**36**) a été isolé avec un rendement de 33%. Il a ensuite été transformé en bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**) par réaction avec HBr avec un rendement de 79% après recristallisation.

On peut noter qu'il n'était en fait pas nécessaire d'isoler par recristallisation l'anomère  $\beta$  de l'Ac<sub>5</sub>-D-galactose (**36**). En effet, l'utilisation du mélange anomérique dans l'étape suivante aurait tout de même permis l'obtention de l' $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**) du fait des effets anomériques. Toutefois, cette recristallisation permet d'avoir un produit propre, ce qui facilite sans doute la recristallisation de l' $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**).

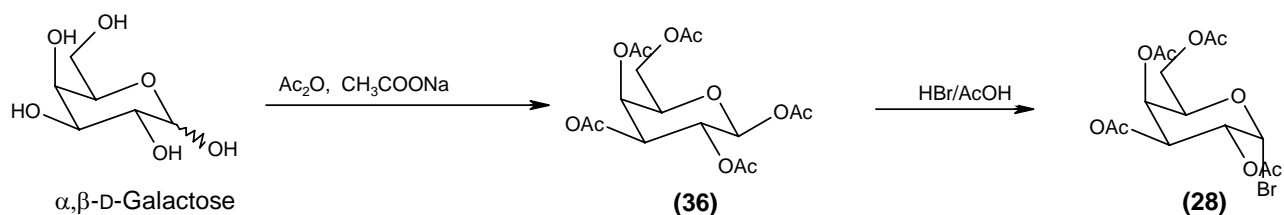


Schéma 85 : Synthèse du bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**)

### III . 2 . B . c . iii . Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1→3)- $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**29**)

La glycosylation du composé Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**27**) a été réalisée suivant les conditions décrites par Helferich (Schéma 86)<sup>170</sup>. Le bromure de galactosyle  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**) a ici été activé par le cyanure de mercure. Contrairement à la précédente glycosylation, le donneur de glycosyle  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**) présente en position 2 une fonction alcool acétylée qui joue le rôle de groupe participant. La formation du glycoside en position  $\beta$  est donc favorisée. Après purification par chromatographie, le composé Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1→3)- $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**29**) a été obtenu avec un rendement de 73%.

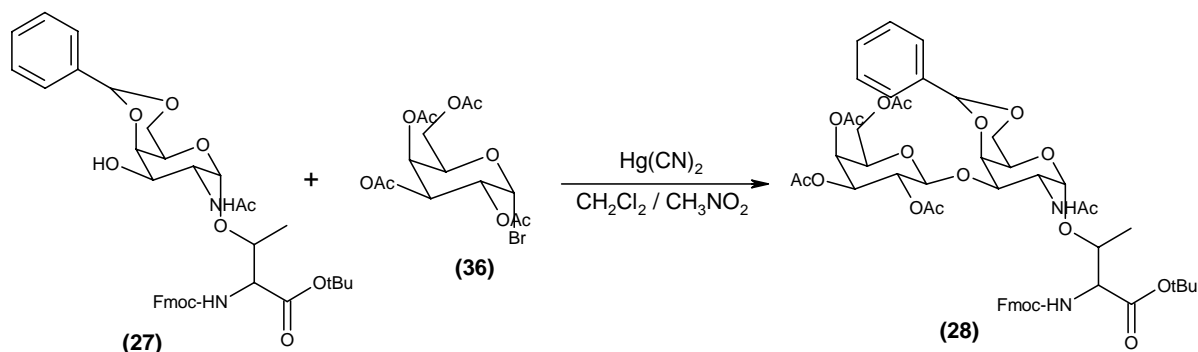


Schéma 86 : Synthèse du composé Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1→3)- $\alpha$ -4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**29**)

### III . 2 . B . c . iv . Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1→3)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**)

Enfin d'obtenir le composé Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1→3)- $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**21**), une succession d'étapes de déprotection et de protection ont été menées (Schéma 87). Tout d'abord, l'acétal en position 1-2 de GalNAc a été éliminé par l'acide acétique à 80°C avec un rendement de 81% après purification par chromatographie. Les fonctions alcool ainsi libérées ont ensuite été acétylées avec un rendement de 82% après purification par chromatographie. Enfin, la fonction acide de la thréonine a été déprotégée par un traitement TFA en présence

d'anisole pour donner le composé Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**) avec un rendement quantitatif.

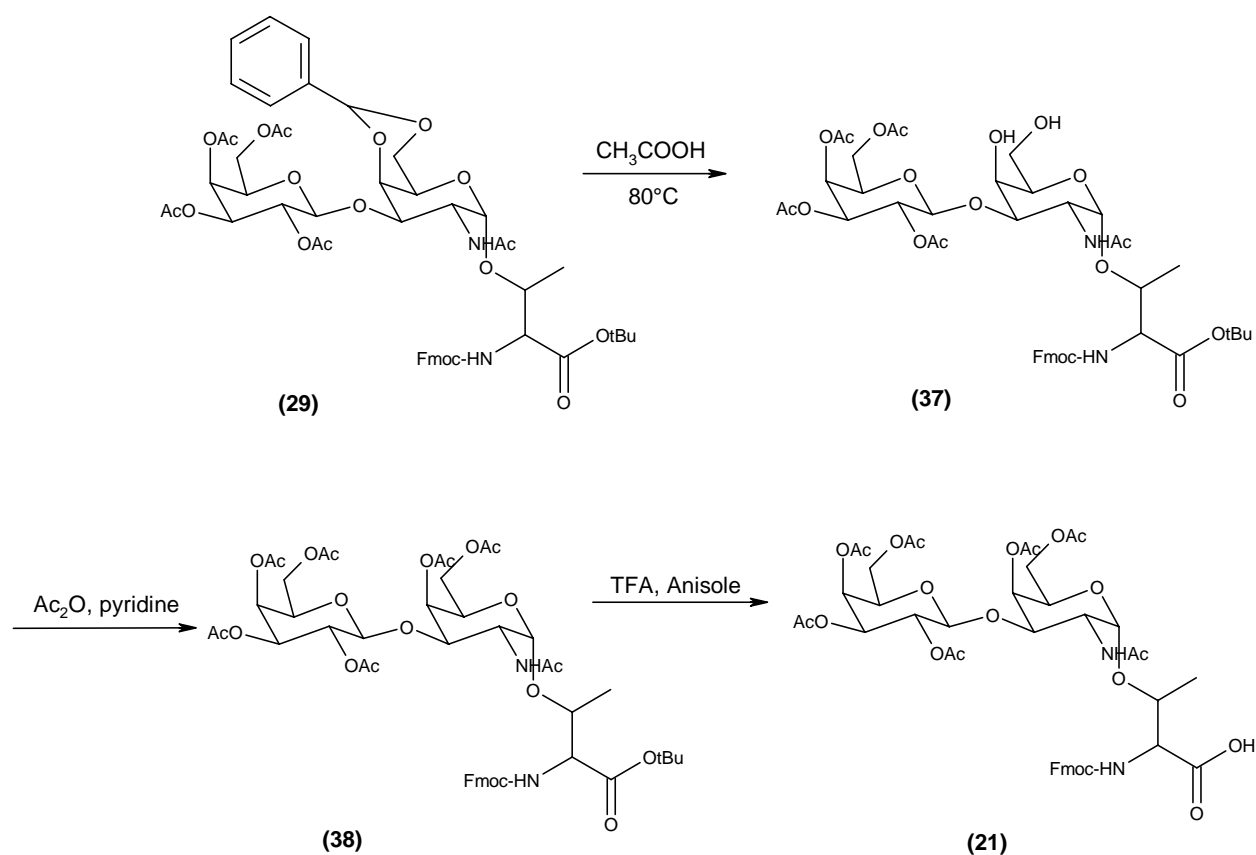


Schéma 87 : Synthèse du composé Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-β-Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**)

### III. 2. C. Synthèse des glycopeptides acétylés (**22**) et (**23**)

**22** : H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDT(α-Ac<sub>3</sub>GalNAc)RPAPGSTA-OH

**23** : H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDT(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-β-Ac<sub>2</sub>GalNAc)RPAPGSTA-OH

L'élongation des glycopeptides acétylés (**22**) et (**23**) a été effectuée comme pour le peptide Aoa-Muc (**3**) sur une résine préchargée Fmoc-Ala-Wang. Les acides aminés glycosylés (**20**) ou (**21**) ont été introduits dans la séquence Muc à la place de la thréonine 12. Le couplage de ces synthons a été réalisé manuellement en utilisant uniquement 1,1 équivalent d'acide aminé glycosylé et HATU comme agent de couplage. Dans ces conditions le couplage n'est que de 92 % dans le cas de l'acide aminé glycosylé (**20**) et de 90 % dans le cas de l'acide aminé glycosylé (**21**). Ces produits étant précieux il est préférable d'acétyler les amines libres qui n'ont pas réagit plutôt que de tenter un deuxième couplage. Après

l'élongation des séquences MucTn ou MucT, le résidu Boc-Aoa-OH a été introduit manuellement en utilisant HATU comme agent de couplage.

Un traitement TFA a ensuite permis, de façon classique, de déprotéger les chaînes latérales des glycopeptides et de les décrocher de la résine. Les glycopeptides acétylés (**22**) et (**23**) ainsi obtenus ont été précipités dans l'éther et filtrés.

### III. 2. D. Glycopeptides déacétylés Aoa-MucTn (18) et Aoa-MucT(19)

**18** :  $\text{H}_2\text{N-O-CH}_2\text{-CO-PPAHGVTSAPDT(GalNAc)RPAPGSTA-OH}$

**19** :  $\text{H}_2\text{N-O-CH}_2\text{-CO-PPAHGVTSAPDT(Gal}(\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc)RPAPGSTA-OH}$

Les fonctions acétyle protégeant les fonctions alcool de la partie saccharidique des glycopeptides (**22**) et (**23**) ont été éliminées par le méthanolate de sodium. Cette réaction doit s'effectuer dans du méthanol anhydre fraîchement distillé et le pH doit être précautionneusement ajusté. Les réactions ont été suivies par HPLC. Pour le synthon Aoa-MucTn (**18**), deux heures de réaction à pH 8,5 sont suffisantes pour avoir une déacétylation complète du glycopeptide. Dans le cas du synthon Aoa-MucT (**19**), ces conditions sont insuffisantes. Le pH a donc été élevé à 9 et la réaction dure environ 5h.

Les deux peptides ont ensuite été solubilisés dans l'eau pour être analysés par HPLC puis directement utilisés pour les réactions de ligation sans être isolés (Figure 38). Les sous-produits observés correspondent d'une part au peptide tronqué acétylé (RPAPGSTA) sur lequel l'acide aminé glycosylé n'a pas été couplé et d'autre part à des adduits formés par l'aminooxy avec les composés carbonylés (formaldéhyde, cétone, acétaldéhyde) présents sous forme de traces dans les solvants. Ces produits ne pouvant réagir dans les réactions de ligation, ils n'ont pas besoin d'être éliminés. On constate donc que la présence du résidu Aoa en position N-terminale est tout à fait compatible avec le traitement au méthanolate de sodium.

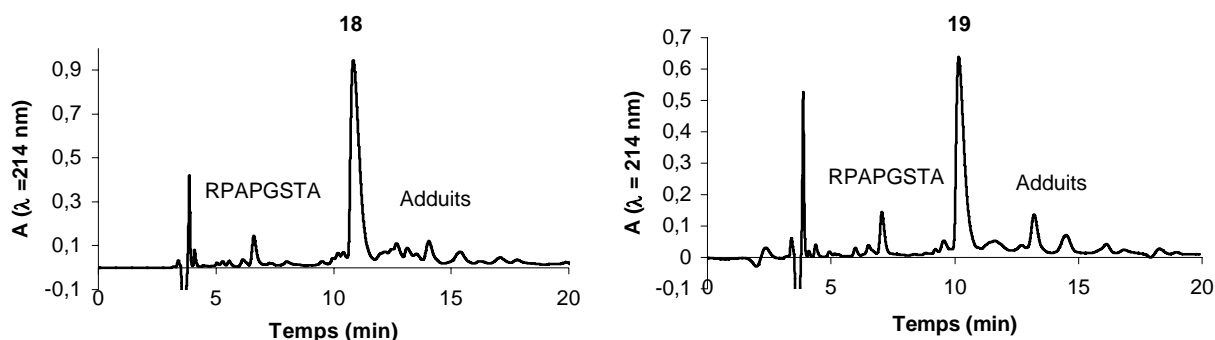


Figure 38 : Profil HPLC des glycopeptides Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**)

### III . 3 . Synthèse du synthon PADRE dialdéhyde masqué

Le synthon PADRE (aKXVAAWTLKAa) dialdéhyde a été synthétisé selon la même méthode que le synthon Muc dialdéhyde. Il devrait donc s'agir du peptide « PADRE(Ser)Acétal » (**39**) obtenu par aminolyse du peptide-résine PADRE-K(S)-A-PAM-PEGA (Schéma 88).

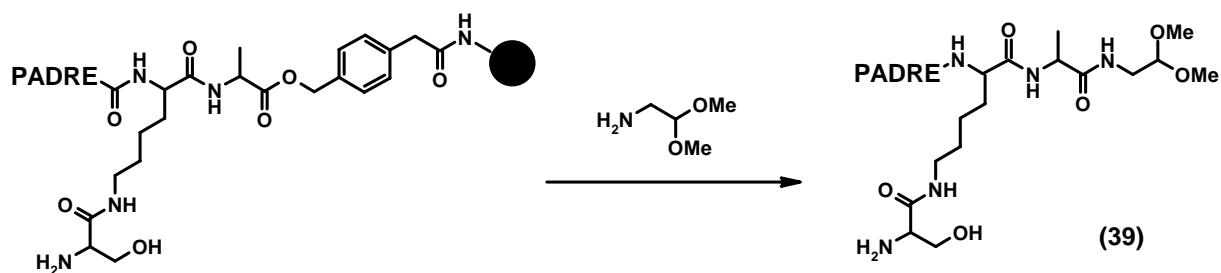


Schéma 88 : Obtention du synthon PADRE(Ser)Acétal (**39**) par aminolyse

Certaines difficultés ont été rencontrées pour la synthèse de ce synthon :

-Malgré l'utilisation de la résine PEGA qui devrait, comme nous l'avons vu précédemment, permettre l'élongation du peptide PADRE, des difficultés de couplages ont été rencontrées en particulier pour les deux acides aminés C-terminaux (Aa) ainsi que la D-alanine N-terminale. Il semblerait que l'utilisation du bras PAM au lieu du bras Rink et/ou l'addition d'une lysine en position C-terminale provoque un changement dans le comportement du peptide dont les couplages semblent plus difficiles. Des doubles couplages ou l'utilisation de HATU comme agent de couplage permettent cependant de contourner ces difficultés.

-Le caractère très hydrophobe du synthon PADRE(Ser)Acétal obtenu après aminolyse du peptide-résine le rend difficilement manipulable pour la suite des opérations (extraction de l'aminolyse, solubilisation, purification...). L'utilisation de ce peptide n'est donc pas souhaitable pour la synthèse des chimères.

Pour faciliter l'élongation et rendre le peptide plus hydrophile, une séquence Muc a été introduite en position C-terminale du peptide PADRE. Le synthon utilisé pour la synthèse des chimères est donc le synthon « PADRE-Muc(Ser)Acétal » (**40**) (Figure 39).

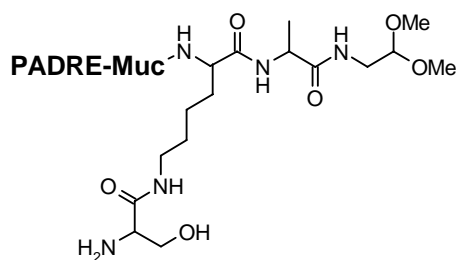


Figure 39 : Synthone PADRE-Muc(Ser)Acétal (40)

Ce synthon a été préparé selon les mêmes conditions opératoires que le synthon Muc(Ser)Acétal (4) avec deux légères modifications :

- Lors de l'élongation du peptide PADRE-Muc : une légère baisse dans les rendements de couplage ayant été observée pour les derniers acides aminés et étant donné les résultats observés lors de l'optimisation de la synthèse du peptide PADRE, le dipeptide Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\psi^{Me, Me}$  Pro)-OH a été introduit à la place des résidus W<sup>7</sup>T<sup>8</sup><sup>164</sup>. Ceci permet d'obtenir une synthèse tout à fait satisfaisante avec une augmentation du rendement d'élongation de 80 à 95%.

- Après l'aminolyse : le peptide restant très hydrophobe il est nécessaire de l'extraire de la résine avec TFE et HFIP.

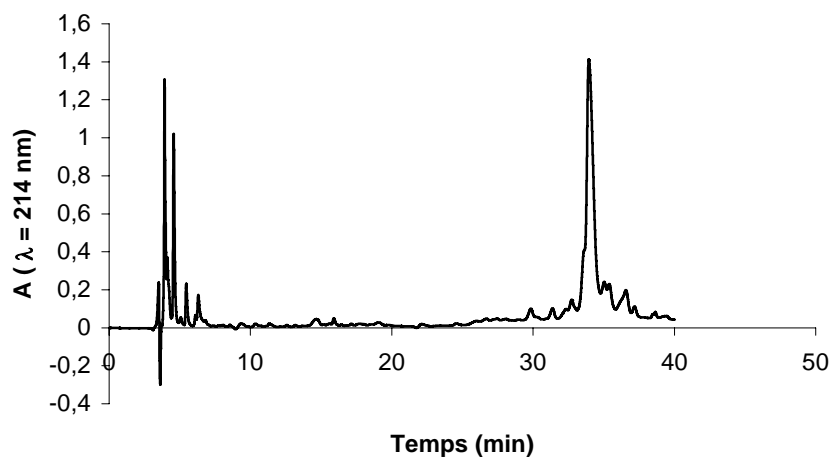


Figure 40 : Profil HPLC du synthon PADRE-Muc(Ser)Acétal (40)



### III . 4 . Synthèse des chimères glycosylées

A partir des synthons PADRE-Muc(Ser)Acétal (**40**), Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**) on peut envisager la synthèse de quatre chimères glycosylées :

-deux chimères « symétriques » préparées avec deux fois le même glycopeptide Aoa-MucTn (**18**) ou Aoa-MucT (**19**) : PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**) et PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) (Schéma 89).

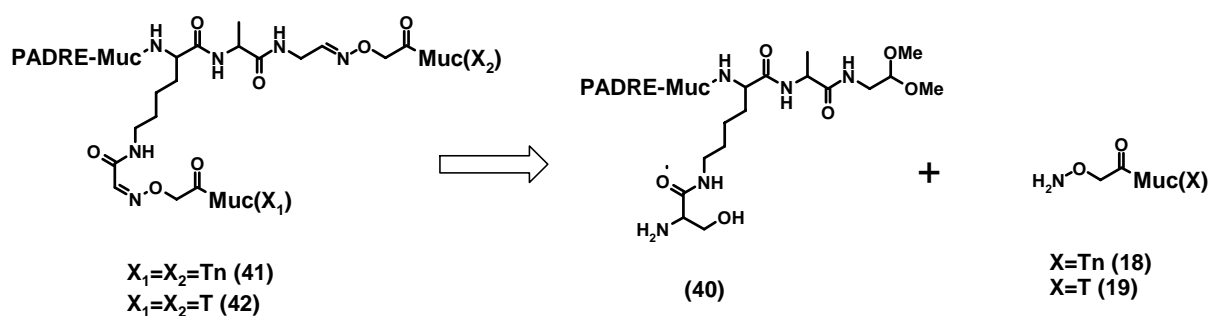


Schéma 89 : Schéma rétrosynthétique des chimères glycosylées (**41**) et (**42**)

-deux chimères « non symétriques » préparées avec les deux différents glycopeptides Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**) : PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**) et PADRE-Muc(MucT)MucTn (**44**) (Schéma 90).

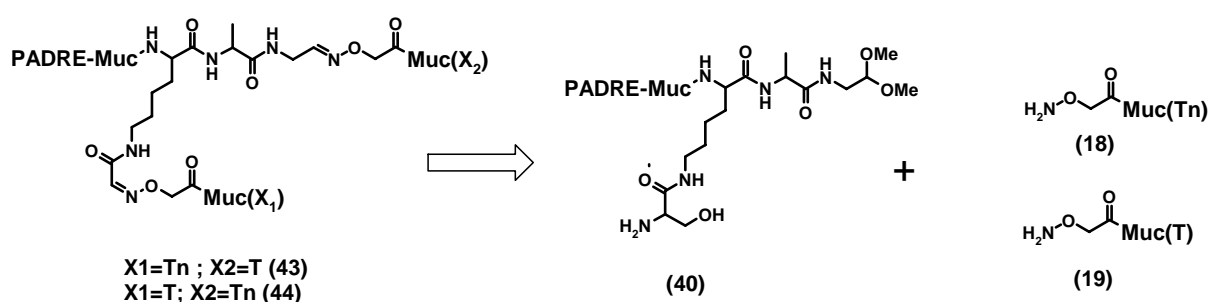


Schéma 90 : Schéma rétrosynthétique des chimères glycosylées (**43**) et (**44**)

### III. 4. A. Synthèse des chimères glycosylées « symétriques » (41) et (42)

La stratégie modulaire développée précédemment pour la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) a été mise au point afin de permettre l'introduction successive de deux peptides aminooxy différents. Cependant, il semble ici intéressant de pouvoir réaliser simultanément les deux ligations avec le même partenaire Aoa-MucTn (18) ou Aoa-MucT (19). Ceci permet en particulier d'éviter une étape de purification intermédiaire.

Par précaution, cette stratégie de double ligation « one-pot » a d'abord été mise au point avec un synthon Aoa-Muc (3). Ceci permet d'autre part la synthèse d'une chimère non glycosylée construite de façon identique qui servira de point de comparaison lors des essais d'immunisation. Une première chimère non glycosylée PADRE-Muc(Muc)Muc (45) a donc d'abord été synthétisée.

#### III. 4. A. a. Synthèse de la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (45)

La synthèse de la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (45) est représentée sur le schéma 91.

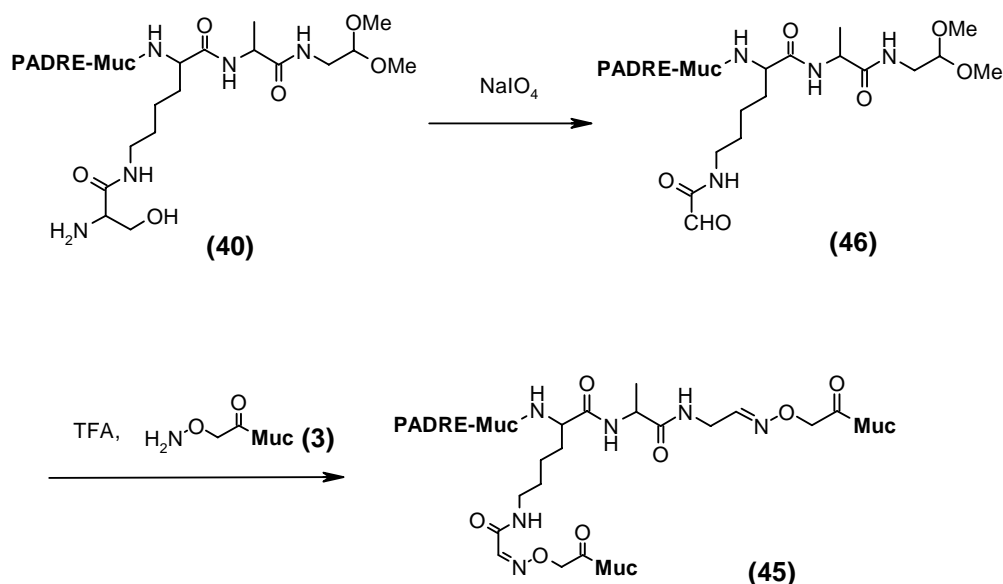


Schéma 91 : Synthèse de la chimère PADRE-Muc1(Muc1)Muc1 (45)

Le peptide PADRE-Muc(Ser)Acétal (40) a été oxydé par NaIO<sub>4</sub> pour former le cétaldéhyde PADRE-Muc(CHO)Acétal (46). Les deux fonctions aldéhyde devant être déprotégées, nous avons accordé peu d'importance à la stabilité de l'acétal. Le peptide

PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) a donc été purifié, contrairement à la synthèse modulaire précédemment décrite, par HPLC. Ceci permet d'obtenir, après lyophilisation, un peptide d'une meilleure pureté facilement manipulable. Etonnamment, l'acétal du peptide PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) est stable durant les étapes de purification, évaporation, lyophilisation. Ceci peut être dû à la basicité de la séquence PADRE-Muc ainsi qu'à une conformation particulière du peptide qui « protégerait » la fonction acétal. Le point isoélectrique du peptide PADRE-Muc est en effet de 10,5 alors qu'il est de 7,84 pour le peptide Muc. Le peptide PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) a ainsi été obtenu avec un rendement total, déterminé à partir du taux de substitution de la résine, de 38 %. Ce rendement est tout à fait satisfaisant vu l'hydrophobie du PADRE.

Le peptide PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) a ensuite été déprotégé par un traitement TFA. Après évaporation de la solution et redissolution dans un tampon acétate pH 4,6, le peptide a été analysé par HPLC. On observe alors, comme le montre le chromatogramme de la figure 41 une dégradation du peptide.

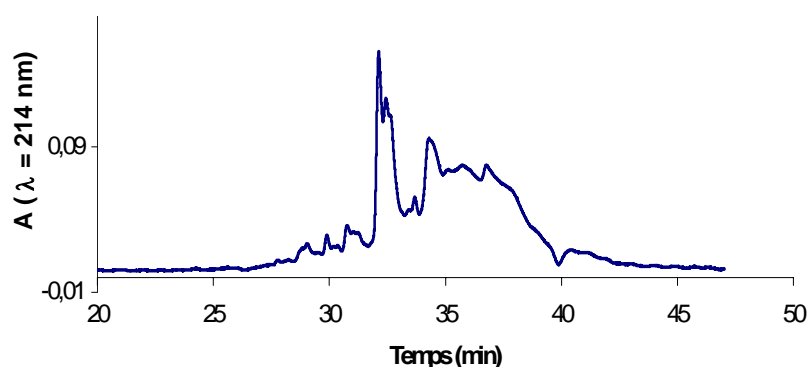


Figure 41 : Profil HPLC du peptide PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) après traitement TFA.

Ceci est sans doute dû à la réactivité des deux aldéhydes en milieu acide qui provoquent des réactions secondaires que nous n'avons pas réussies à identifier. Dans le cas de la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**), nous avons déjà rencontré des difficultés lors de la déprotection de l'acétal. Il s'agissait alors d'une réaction de transoximation sur la première liaison oxime, or, ici, aucune liaison oxime n'est déjà formée. Après plusieurs essais, la solution adoptée a finalement été, de même que précédemment, de déprotéger l'acétal en présence du partenaire Aoa-Muc (**3**). Cette solution pourrait être problématique dans le cas de chimères glycosylées où la partie saccharidique du partenaire aminoxy est déprotégé. Nous avons donc diminué la concentration de TFA à 10 %. Celle-ci est suffisante pour déprotéger l'acétal et nous avons vérifié que les partenaires aminoxy glycosylés (**18**) et (**19**) sont stables dans ces conditions.

La réaction a été réalisée avec trois équivalents de partenaire Aoa-Muc (**3**) pour permettre la ligation sur les deux aldéhydes. Après le traitement TFA et l'évaporation de la solution, le produit obtenu a été solubilisé dans l'eau et analysé par HPLC et spectrométrie de masse (Figure 42). Les deux produits observés sont PADRE-Muc(CHO)Muc (**47**) et PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) qui est majoritaire. Ceci montre, comme nous l'avons déjà constaté, que la réaction de ligation sur le méthylaldéhyde est instantanée dans ces conditions et que la réaction de ligation sur le cétoaldéhyde a également été activée en milieu acide. Les deux produits PADRE-Muc(CHO)Muc (**47**) et PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) sont coélués du fait de la présence du peptide PADRE. Les changements de taille avec l'ajout d'une séquence Muc hydrophiles ne permettent pas de compenser le caractère très hydrophobe du peptide PADRE.

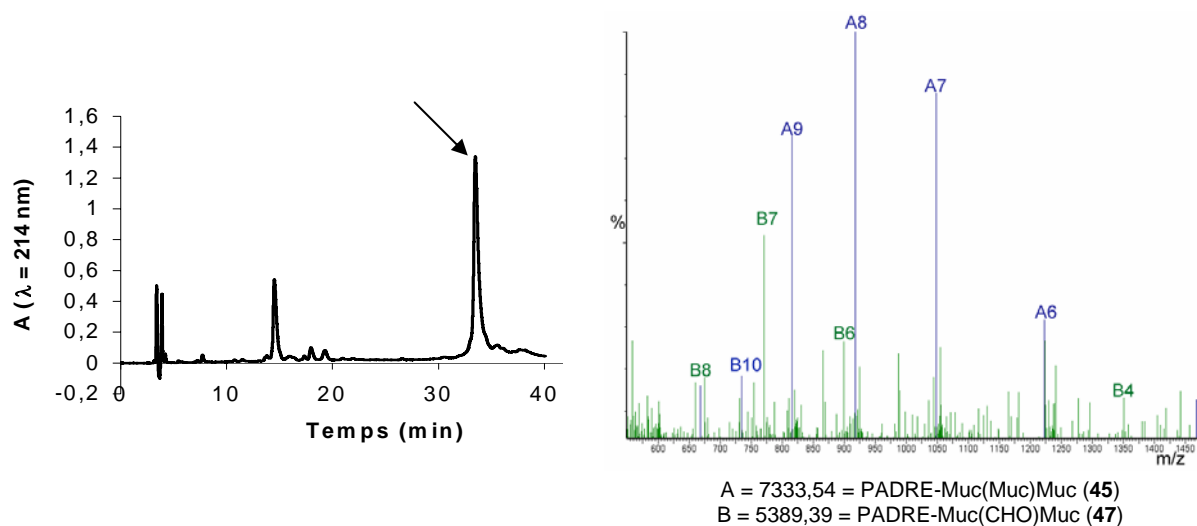


Figure 42 : Profil HPLC et spectre de masse du milieu réactionnel après traitement au TFA du peptide PADRE-Muc1(CHO)Acétal (**46**) en présence du synthon Aoa-Muc (**3**)

L'évolution de la réaction a ensuite été suivie par HPLC et spectrométrie de masse. Le produit intermédiaire PADRE-Muc(CHO)Muc (**47**) diminue rapidement dans les premières heures mais il semble ensuite très difficile d'avoir une réaction complète dans ces conditions. Ceci est sans doute dû à un problème d'accessibilité du cétoaldéhyde qui est positionné, après la ligation sur le méthylaldéhyde en position centrale du peptide.

Après 72h d'agitation, nous avons donc décidé de stopper la réaction. Le produit a été purifié par HPLC et lyophilisé. Les produits PADRE-Muc(CHO)Muc (**47**) et PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) étant difficilement séparables en HPLC, le produit final obtenu avec un rendement de 32 % contient une fraction minimale du produit PADRE-Muc(CHO)Muc (**47**) (Figure 43). L'analyse de ce produit en LC-MS sur une colonne C4 ne nous a pas permis de

séparer ces produits. Nous n'avons donc pas pu quantifier le produit secondaire PADRE-Muc(CHO)Muc (**47**).

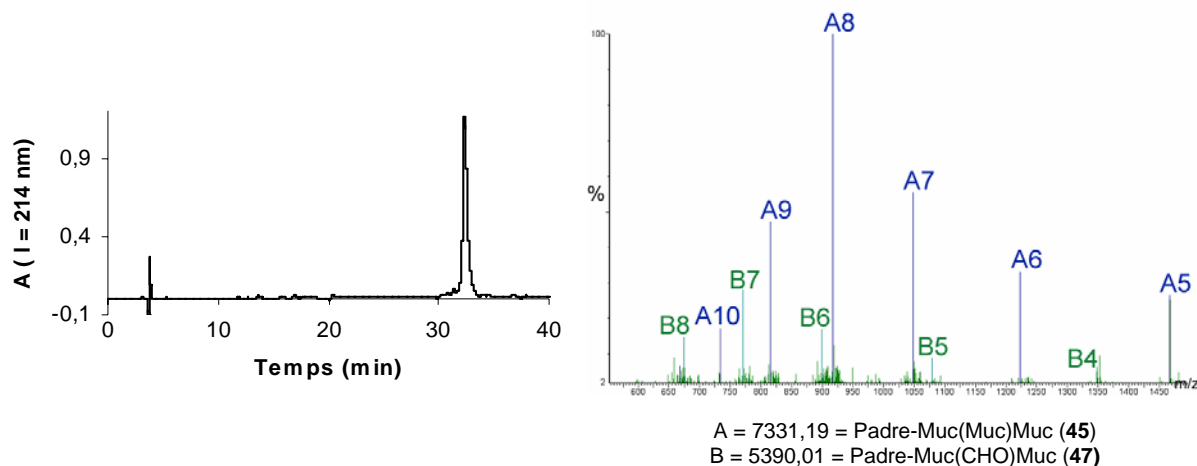


Figure 43 : Profil HPLC et spectre de masse de la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**)

### III . 4 . A . b . Synthèse des chimères (**41**) et (**42**)

Les chimères PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**) et PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) ont été synthétisées de la même façon que la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) en remplaçant le partenaire Aoa-Muc (**3**) par le partenaire Aoa-MucTn (**18**) ou Aoa-MucT (**19**). Comme nous l'avons évoqué précédemment, la liaison *O*-glycosidique de ces derniers est stable durant le traitement TFA à 10%, suffisant pour déprotéger l'acétal. La présence du substituant acétamido en position 2 des résidus saccharidiques augmente en fait la stabilité de la liaison *O*-glycosidique même si les fonctions alcools des autres positions sont déacétylées.

La chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**), obtenue avec un rendement de 53%, et la chimère PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**), obtenue avec un rendement de 41%, contiennent, de même que précédemment, une fraction minime du produit intermédiaire PADRE-Muc(CHO)MucTn ou PADRE-Muc(CHO)MucT, ce produit n'ayant pas pu être séparé par LC-MS (Figure 44).

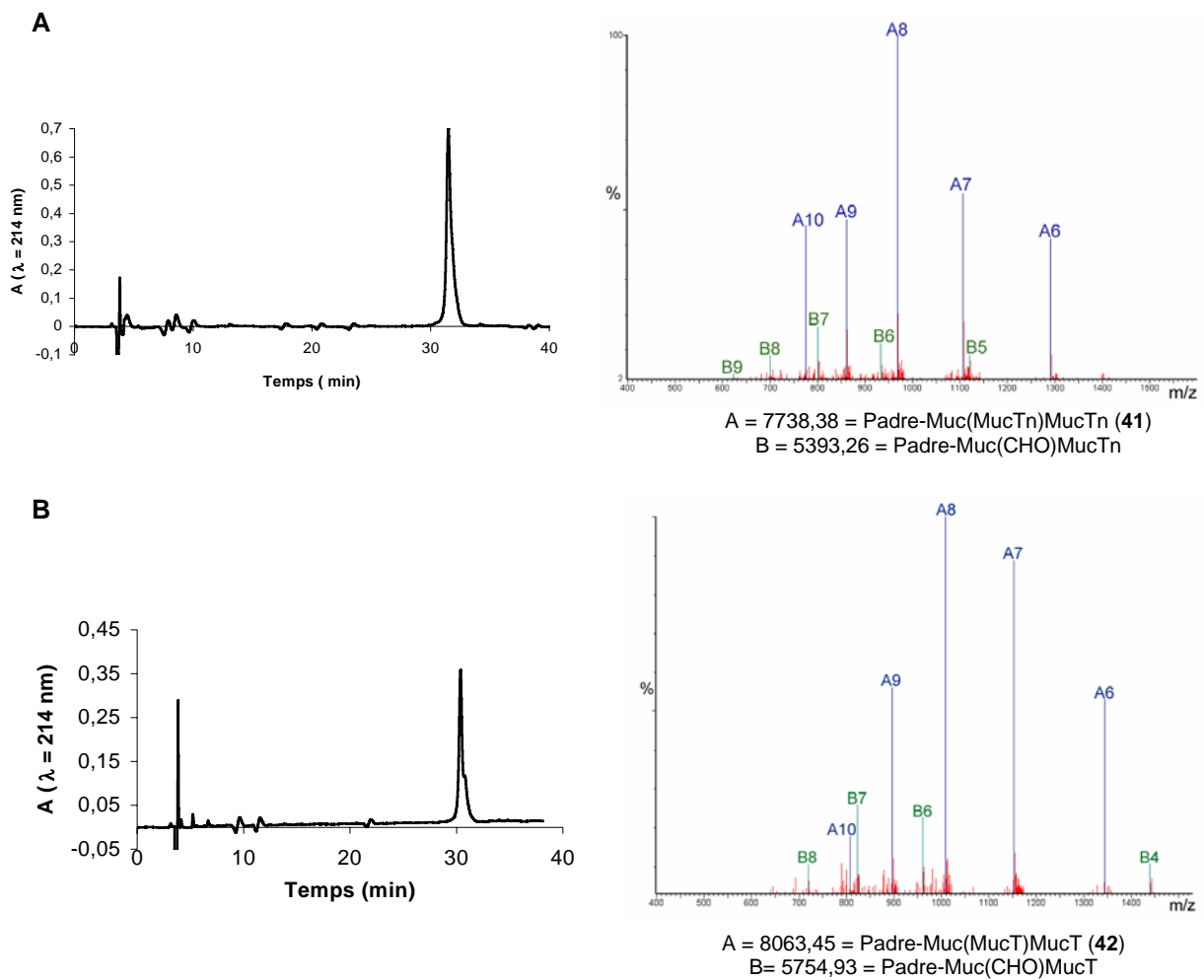


Figure 44 : Profil HPLC et spectre de masse des chimères glycosylées (**41**) (A) et (**42**) (B)

### III. 4. B. Synthèse de la chimère glycosylée « non symétrique » PADRE-Muc(MucTn)MucT (43)

A partir du peptide PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) purifié par HPLC, la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**) a été synthétisée selon la même stratégie modulaire que la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**) (Schéma 92). Cette chimère a été choisie car, contrairement à la synthèse de la chimère PADRE-Muc(MucT)MucTn (**44**), elle permet d'introduire le partenaire Aoa-MucT (**19**) qui est le plus précieux en dernier.

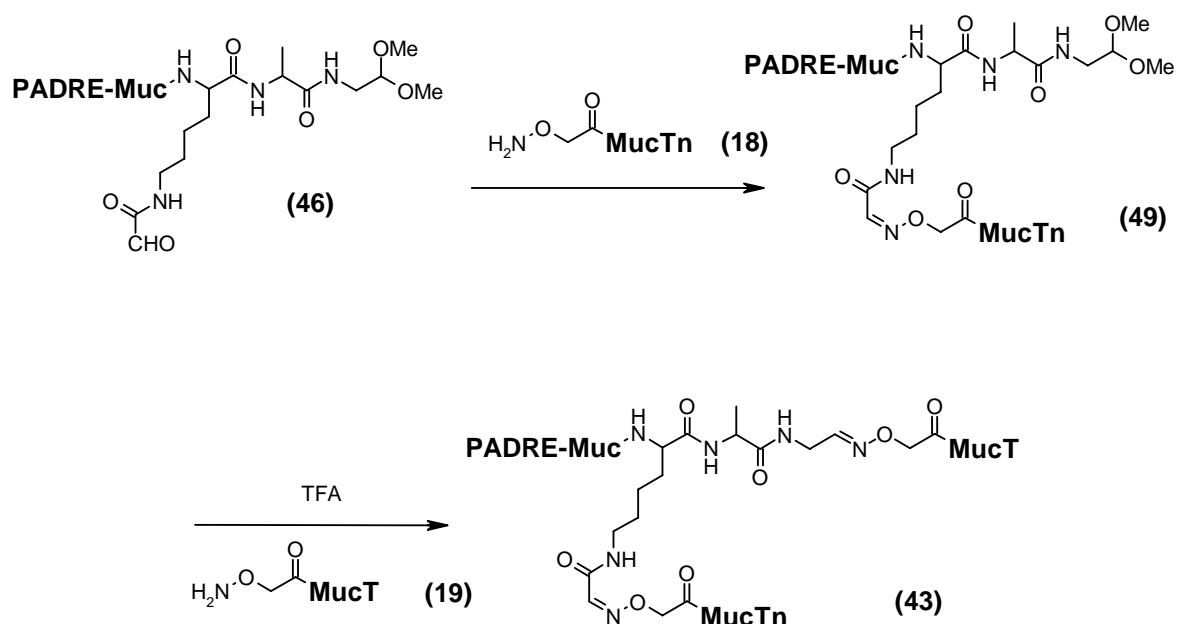


Schéma 92 : Synthèse de la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**)

De même que précédemment, la réaction de ligation entre le peptide PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) et le peptide Aoa-MucTn (**18**) permettant d'obtenir le produit PADRE-Muc(MucTn)Acétal (**49**) n'est pas totale. Indépendamment de l'encombrement stérique dû à la condensation d'un premier partenaire aminoxy dans le cas de la synthèse des chimères précédentes, la difficulté de couplage sur le cétoaldéhyde peut, en fait, être due à un phénomène d'agrégation du peptide PADRE.

Le produit PADRE-Muc(MucTn)Acétal (**49**) a été purifié par HPLC et lyophilisé en présence du partenaire Aoa-MucT (**19**). Le produit a alors été analysé par HPLC et la quantité du partenaire Aoa-MucT (**19**) a été réajustée. L'acétal a ensuite été déprotégé par un traitement TFA. La présence du partenaire Aoa-MucT (**19**) lors de la lyophilisation ou du traitement TFA permet d'éviter que l'aldéhyde généré attaque la liaison oxime déjà formée.

Le produit PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**) ainsi obtenu a ensuite été purifié par HPLC et lyophilisé.

On observe sur le spectre de masse du produit obtenu après purification (Figure 45), la présence du produit PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**). Ceci peut être expliqué par le fait que la réaction de ligation sur le cétoaldéhyde n'est pas totale et que le produit PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) n'est pas séparable du produit PADRE-Muc(MucTn)Acétal (**49**). Le traitement TFA réalisé pour déprotéger l'acétal, en présence du partenaire Aoa-MucT (**19**), a sans doute activé la réactivité du cétoaldéhyde restant libre sur lequel le partenaire Aoa-MucT (**19**) s'est alors condensé.

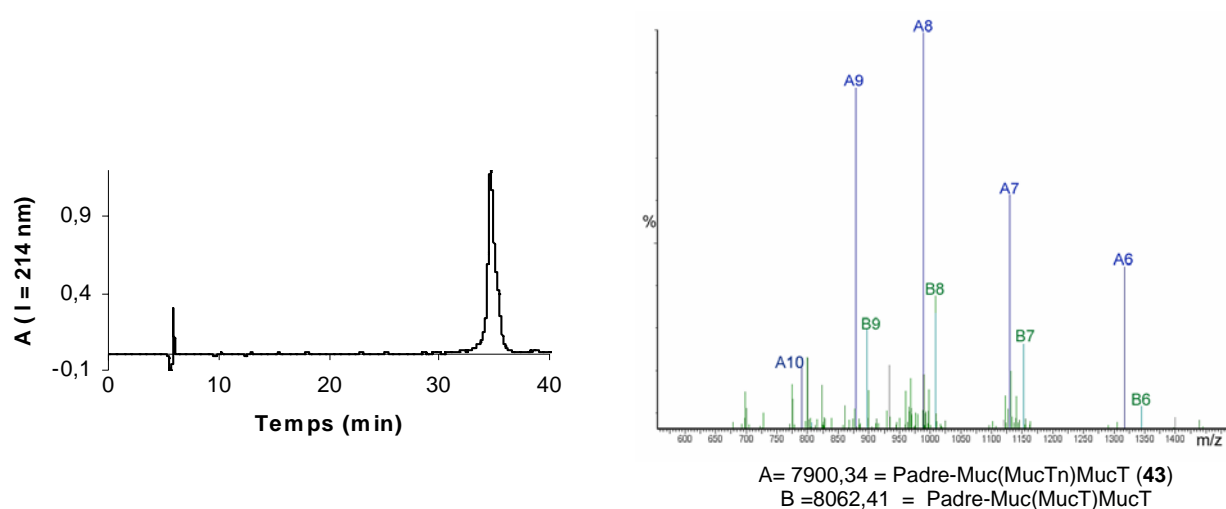


Figure 45 : Profil HPLC et spectre de masse de la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**)

La stratégie de synthèse précédemment développée pour la synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**) ainsi que le savoir-faire de l'équipe du professeur Kunz nous a permis de synthétiser trois chimères glycosylées PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**), PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) et PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**). Ces trois chimères possèdent toutes un sous-produit dû à une réaction incomplète sur le cétoaldéhyde. Ces sous-produits que nous n'avons pas réussi à séparer du produit final, sont cependant présents, au vu des spectres de masse en quantité minime. De plus, l'utilisation d'un autre épitope T auxiliaire permettrait sans aucun doute de séparer ces produits et d'obtenir ainsi des produits purs avec des rendements plus importants.

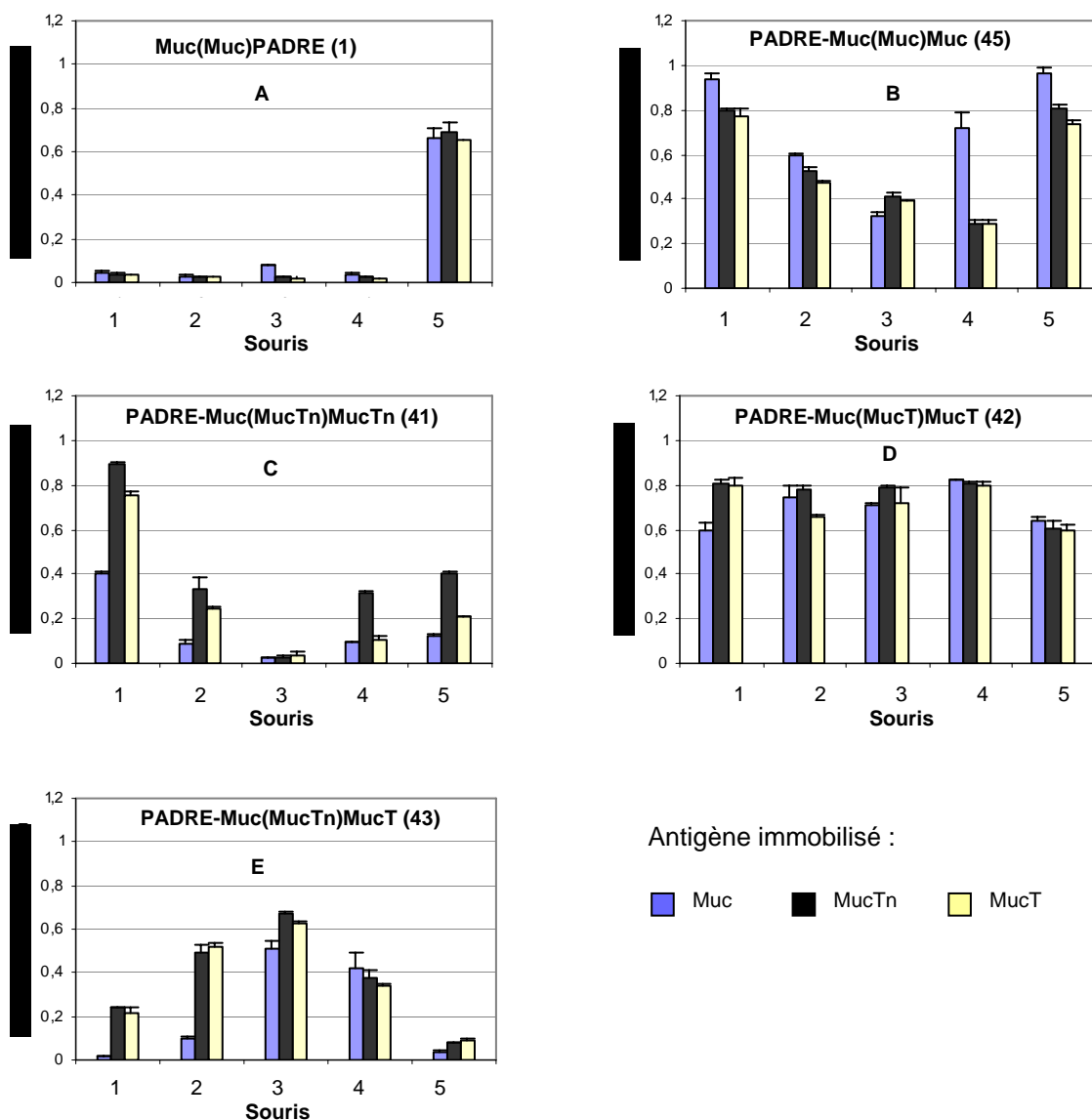
L'étape suivante consiste maintenant à tester le potentiel immunogène de ces chimères et surtout la spécificité des anticorps produits.



### **III . 5 . Etude de l'immunogénicité des chimères glycosylées**

Lors de ces nouveaux essais d'immunisation les trois chimères glycosylées PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**), PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) et PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**) ont été comparées avec la chimère non glycosylée PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) construite de la même façon et avec la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**) dont nous avons déjà montré l'immunogénicité. En tirant parti des premiers résultats d'immunisation, le même immunogène a cette fois été administré à 5 souris et nous avons diminué la quantité d'immunogène qui n'est ici que de 25 µg par souris au lieu de 100 µg. D'autre part, l'adjuvant utilisé est l'alum qui est, avec MF59, le seul adjuvant autorisé en thérapie humaine<sup>171</sup>. De même que précédemment, les immunogènes ont été injectés par voie sous-cutanée et trois injections ont été réalisées à 15 jours d'intervalle.

Les sérums prélevés 15 jours après le dernier rappel ont été analysés par ELISA. Afin d'analyser les différences de spécificité entre les anticorps induits par les différentes chimères vis-à-vis de substrats glycosylés ou non, nous avons réalisé 3 différents tests ELISA avec comme antigène immobilisé, un peptide Muc ou les glycopeptides MucTn et MucT. Les résultats sont représentés sur la figure 46.



**Figure 46 :** Comparaison de l'immunogénicité des chimères non glycosylées (1) et (45) et des chimères glycosylées (41), (42) et (43) et de la spécificité des anticorps produits vis-à-vis d'antigènes non glycosylés ou glycosylés

Les souris ont été immunisées trois fois à 15 jours d'intervalle en sous-cutané avec 25 µg de peptide ou glycopeptide dans l'alum. Les sérums ont été prélevés 15 jours après le dernier rappel et dilués au 1/100. Les anticorps anti-Muc, anti-MucTn et anti-MucT ont été révélés par un anticorps de chèvre anti-Ig de souris couplé à la peroxydase. Pour chacune des chimères sont représentés les résultats obtenus avec chaque souris.

Une première observation est la diminution de l'immunogénicité de la chimère Muc(Muc)PADRE (1) (Figure 46A) par rapport aux résultats obtenus lors des premiers essais d'immunisation (Figure 34). Même si une souris (S5) répond fortement, le changement d'adjuvant ou la diminution des quantités d'immunogènes injectés semble défavoriser la production d'anticorps. Ces résultats ne sont en fait pas surprenants, l'alum étant connu pour être un adjuvant moins puissant que l'adjuvant de Freund mais beaucoup moins toxique.

Une deuxième observation est l'augmentation de l'immunogénicité entre la chimère (1) (Figure 46A) et la chimère (45) (Figure 46B). Malgré l'hétérogénéité des résultats observés pour les différentes souris, ce résultat est statistiquement significatif (selon le test de Student :  $p < 0,05$  pour la réponse anti-Muc). Cette augmentation de l'immunogénicité peut être due à quatre facteurs (Figure 47) :

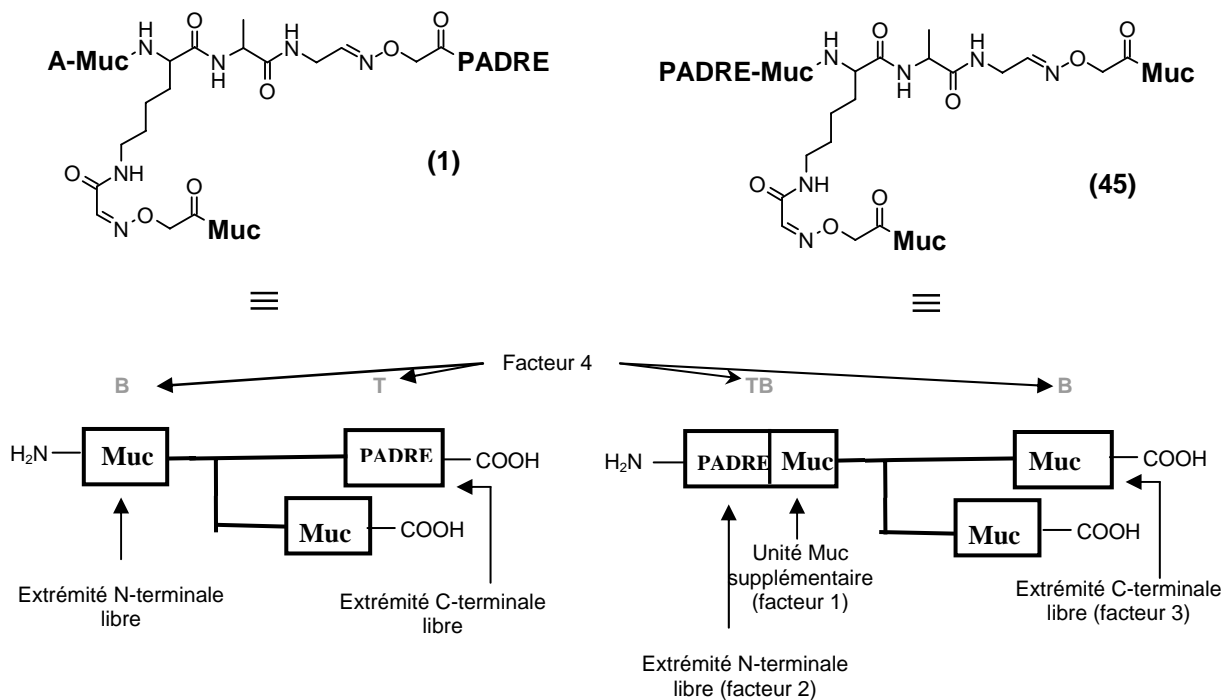


Figure 47 : Comparaison des chimères Muc(Muc)PADRE (1) et PADRE-Muc(Muc)Muc (45)

- 1) L'addition d'une unité de répétition Muc incluse dans le squelette peptidique.
- 2) L'inversion de l'orientation de l'épitope PADRE qui possède soit l'extrémité C-terminale libre (chimère (1)) soit l'extrémité N-terminale libre (chimère (45)).
- 3) Le changement des extrémités libres des unités Muc. Dans la chimère (1) une unité Muc a son extrémité N-terminale libre et une autre unité a son extrémité C-terminale libre, alors que dans la chimère (45) les deux extrémités libres des unités Muc sont les extrémités C-terminales. Nous avons en effet déjà évoqué le fait que l'extrémité par laquelle est fixé un épitope B, ayant l'autre extrémité libre, sur une protéine porteuse<sup>159</sup> ou dans un MAP<sup>160</sup> peut influencer l'immunogénicité de la chimère.
- 4) L'inversion simultanée de l'orientation des épitopes PADRE et Muc. En effet de nombreux auteurs ont montré l'influence de la position relative des épitopes B et T dans des immunogènes linéaires (TB *versus* BT) sur leur immunogénicité ou la spécificité des

anticorps produits<sup>172</sup>. Dans la plupart des cas, le peptide TB semble plus immunogène que le peptide BT et l'addition d'un espaceur entre les deux épitopes n'intervient pas dans l'immunogénéité<sup>172b</sup>. Dans notre cas, si l'on ne considère pas la partie branchée, la chimère (1) est de type BT alors que la chimère (45) est de type TBB, on a donc bien une inversion de polarité entre les épitopes B et T.

Plusieurs observations peuvent ensuite être faites sur les différences observées entre la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (45) et les chimères glycosylées de même construction (41), (42), et (43).

La chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (41) (Figure 46C) semble être moins immunogène que la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (45) (Figure 46B), une souris (S3) n'ayant même répondu que très faiblement. Le peptide non glycosylé Muc est en particulier nettement moins bien reconnu par les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (41) que par ceux induits par la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (45) (selon le test de student :  $p < 0,02$ ). Par contre, le fait le plus marquant est que pour chacune des souris (sauf la souris S3), les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (41) reconnaissent mieux le glycopeptide MucTn que le peptide Muc.

Ces résultats pourraient être en relation avec le changement de conformation du squelette peptidique induit par l'introduction d'un résidu GalNAc sur le déterminant DTR<sup>39</sup>. Cette différence de conformation expliquerait la meilleure reconnaissance des anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (41) vis-à-vis du glycopeptide MucTn. Ces anticorps seraient donc spécifiques d'un antigène de type conformationnel. Cette différence de reconnaissance pourrait également être due au fait que les anticorps sont en fait spécifiques du résidu GalNAc lui-même. Cependant, des données décrites par Karsten<sup>36b</sup> mais non publiées semblent indiquer que les anticorps monoclonaux induits par MUC1 tumorale, qui ont une meilleure affinité pour les peptides glycosylés, ne reconnaissent pas l'antigène saccharidique seul. Afin de déterminer avec certitude si les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (41) sont spécifiques du GalNAc seul ou du glycopeptide adoptant une certaine conformation du squelette peptidique due à la présence du GalNAc, plusieurs études pourraient être menées. D'une part, afin de déterminer l'affinité des anticorps vis-à-vis du saccharide, il serait intéressant de tester les anticorps vis-à-vis d'un autre glycopeptide, possédant le même épitope saccharidique mais ayant une séquence totalement

différente de la séquence Muc, ou de réaliser des essais d'inhibition avec un saccharide en solution. D'autre part, afin de confirmer un changement de conformation entre le glycopeptide MucTn et le peptide Muc, il serait utile de réaliser une étude structurale de ces antigènes. En effet, ceux-ci possèdent une unité de répétition complète, soit 20 acides aminés, alors que le peptide étudié par Shuman *et al.*<sup>39</sup>, n'était composé que de neuf résidus.

Ces deux hypothèses proposées pour expliquer la différence de reconnaissance entre le peptide Muc et le glycopeptide MucTn par les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**), à savoir un changement de conformation ou l'induction d'anticorps spécifiques de GalNAc, ne sont en fait pas exclusives. Du fait du changement de conformation, il est possible que la partie saccharidique soit principalement exposée ce qui induirait la production d'anticorps spécifiques de GalNAc et éventuellement les résidus adjacents.

En ce qui concerne la chimère PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) (Figure 46D), celle-ci semble être un meilleur immunogène que la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) (Figure 46B). En effet, même si la différence entre ces deux chimères n'est pas statistiquement significative, la réponse est plus homogène pour les cinq souris du même lot dans le cas de la chimère PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) que dans le cas de la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**). Par contre, les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucT)MucT (**45**) semblent reconnaître de façon identique l'antigène Muc et les antigènes glycosylés MucTn et MucT, ne suggérant aucune spécificité vis-à-vis de l'antigène glycosylé. Les antigènes reconnus seraient donc essentiellement spécifiques de la séquence du squelette peptidique.

De façon inattendue, les anticorps induits par les chimères PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**) ou PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**), se comportent de façon différente. Les premiers seraient, du fait d'une conformation particulière imposée par le résidu GalNAc, spécifiques d'un antigène de type conformationnel ou de l'antigène saccharidique, alors que les seconds seraient spécifiques d'un antigène de type séquentiel. Les résultats pourraient donc indiquer que les résidus saccharidiques GalNAc ou GalGalNAc n'ont pas le même effet sur la structure du squelette peptidique.

Afin de comprendre ces résultats, il serait intéressant de pouvoir comparer les deux conformations des glycopeptides MucTn et MucT, l'étude conformationnelle d'un glycopeptide MucT n'ayant à notre connaissance jamais été réalisée. Outre la spécificité des

anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**), une conformation différente, plus rigide, du glycopeptide MucTn par rapport à celle du peptide Muc ou du glycopeptide MucT, pourrait également expliquer la moins bonne immunogénicité de la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**) par rapport aux chimères PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) ou PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**). Il a en effet déjà été décrit que les zones flexibles des protéines montraient une meilleure immunogénicité ou antigénicité<sup>173</sup>.

Il est également important de noter que la conformation des peptides ou glycopeptides peut être modifiée lors de leur fixation sur les plaques ELISA<sup>174</sup>. Afin de s'affranchir de ce problème, des essais d'inhibition devraient être réalisés. Ceci permettrait en particulier de tester l'affinité des anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucT)MucT(**42**) qui sont, d'après nos hypothèses, spécifiques du squelette peptidique, vis-à-vis de l'antigène MucTn qui, d'après nos hypothèses, adopte en solution une conformation exposant principalement l'épitope saccharidique et les résidus adjacents.

Il n'est également pas à exclure que ces différences d'immunogénicité pourraient être dues à une différence de stabilité de ces constructions dans les fluides biologiques. Par ailleurs, la façon dont celles-ci peuvent être « processées » par les cellules présentatrices d'antigènes pour présenter l'épitope T auxiliaire PADRE ou un autre épitope T auxiliaire glycosylé ou non issus de nos chimères peut également avoir son importance. Ceci demanderait toutefois de plus amples connaissances sur la réponse immunitaire B et T auxiliaire induite par des glycopeptides.

En ce qui concerne la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**) (Figure 46E), les résultats sont très hétérogènes. Une souris répond faiblement (S5). Pour les souris S1 et S2, les anticorps produits, comme les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**) (Figure 46C), semblent reconnaître exclusivement les glycopeptides MucTn et MucT et pour les deux autres souris S3 et S4, les anticorps produits, comme les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) (Figure 46D) reconnaissent aussi bien le peptide Muc que les glycopeptides MucTn et MucT.

L'hétérogénéité de ces résultats peut s'expliquer par le fait que les anticorps induits par la chimère PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**), sont spécifiques soit de la partie MucTn soit de la partie MucT. Vu la différence de comportement de ces deux types d'anticorps, il n'est pas étonnant d'avoir des résultats aussi différents. Les anticorps induits par cette chimère dans les

souris S1 et S2 semblent avoir été principalement induits par l'épitope MucTn alors que dans les souris S3 et S4, ceux-ci semblent avoir été induits principalement par l'épitope MucT.

### **III . 6 . Conclusion**

Le savoir-faire acquis lors de la synthèse de chimères non glycosylées, dont nous avons montré l'immunogénicité, nous a permis dans ce chapitre de synthétiser de nouvelles chimères glycosylées. Pour des raisons de synthèse, la géométrie de ces chimères glycosylées est différente de celle que nous avons étudiée précédemment et nous avons pu montrer la meilleure immunogénicité de cette nouvelle construction.

Ceci est à notre connaissance la première synthèse de constructions glycoprotéiques branchées analogue de Muc1 possédant un épitope peptidique T auxiliaire universel et les épitopes saccharidiques T et/ou Tn dont l'immunogénicité a été rapportée. La stratégie de synthèse modulaire a permis, de façon très enrichissante, de comparer l'introduction dans une même construction de deux peptide Muc non glycosylés, de deux glycopeptides MucTn, de deux glycopeptides MucT ou d'un glycopeptide MucTn et un glycopeptide MucT

De façon inattendue, les anticorps induits par le glycopeptide MucT se comportent de façon différente de ceux induits par le glycopeptide MucTn, ce qui est également confirmé par l'hétérogénéité des résultats obtenus avec la chimère possédant ces deux épitopes. Ceci ouvre donc la voie à de nombreuses études nécessaires pour comprendre la différence d'immunogénicité et de spécificité des anticorps induits observée entre les chimères possédant le glycopeptide MucTn ou MucT. La spécificité des anticorps induits par le glycopeptide MucTn vis-à-vis du glycopeptide MucTn reste à élucider, ainsi que la non-spécificité des anticorps induits par le glycopeptide MucT vis-à-vis des antigènes Muc, MucT, ou MucTn. De même la différence dans la rigidité du squelette peptidique pouvant expliquer la différence d'immunogénicité reste à confirmer.

Par ailleurs, il semble indispensable de tester la capacité des anticorps induits par les différentes chimères à reconnaître les cellules tumorales.

## IV . Perspectives concernant la géométrie des immunogènes non glycosylés

Les résultats des deux séries d'immunisation décrits dans les deux chapitres précédents obtenus avec des chimères non glycosylées ont soulevé certaines questions quant au rôle de la liaison oxime, de la position de la deuxième unité répétitive Muc, de l'ajout d'une troisième unité répétitive et de l'orientation des épitopes. La méthode de synthèse modulaire que nous avons mise au point devrait nous permettre de synthétiser de nouvelles chimères afin de tester plus en détail ces différents paramètres.

### IV . 1 . Conception des nouvelles chimères

Lors de la deuxième série d'immunisation nous avons observé que la réponse immunitaire dirigée contre Muc induite par la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) était amplifiée par rapport à celle induite par la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**). Comme nous l'avons décrit précédemment (Figure 47), cette augmentation de l'immunogénicité peut être due à l'addition d'une unité de répétition Muc incluse dans le squelette peptidique (facteur 1), à l'inversion de l'orientation de l'épitope PADRE (facteur 2), aux changements des extrémités libres des unités Muc (facteur3) ou à l'inversion simultanée de ces deux épitopes (facteur 4).

Afin de déterminer l'influence de chacun de ces quatre facteurs, nous avons conçu deux nouvelles chimères (**50**) et (**51**) permettant d'étudier indépendamment ces différents paramètres (Figure 48) :

- Par rapport à la chimère Muc(Muc)PADRE (**1**), la chimère Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**) possède une unité supplémentaire Muc incluse dans le squelette peptidique (facteur 1).

- Dans la chimère (Muc)<sub>2</sub>Muc-PADRE (**51**), l'unité Muc qui avait son extrémité N-terminale libre dans la chimère Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**) est maintenant fixée par cette extrémité. Les deux unités Muc ont donc leur extrémité C-terminale libre comme dans la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) (facteur 3).

- Dans la chimère (Muc)<sub>2</sub>Muc-PADRE (**51**), comme dans les chimères (**1**) et (**50**) le PADRE a son extrémité C-terminale libre alors que dans la chimère PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**), celui-ci a son extrémité N-terminale libre (facteur 2)



- Entre les chimères (50) et (45), on a une inversion relative de l'orientation des épitopes Muc et PADRE l'un par rapport à l'autre (facteur 4). La chimère (50) est de type BBT pour la partie linéaire alors que la chimère (45) est de type TBB.

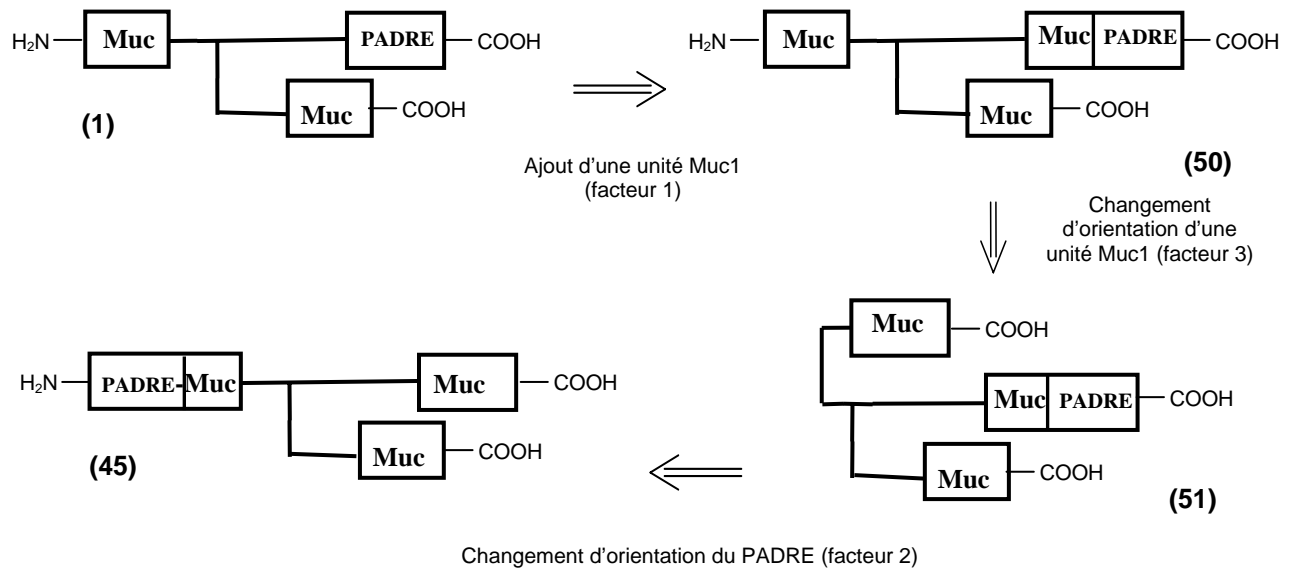


Figure 48 : Conception des deux nouvelles chimères (50) et (51)

D'autre part, lors de la première série d'immunisation, nous avons pu observer, en tout cas en ce qui concerne les immunogènes ne possédant pas l'épitope PADRE, le bénéfice apporté par une présentation branchée. Ceci peut être dû à la géométrie de la molécule mais également à l'addition de la liaison oxime ou à l'orientation de cette deuxième unité Muc qui possède une extrémité C-terminale libre alors que dans le cas des chimères linéaires, seule l'extrémité N-terminale est libre. Afin de connaître précisément l'influence de la géométrie, il serait donc intéressant de pouvoir comparer les chimères branchées (1), (50), (51) et (45), possédant toutes deux liaisons oxime et au moins une unité Muc dont l'extrémité C-terminale est libre, à une nouvelle chimère linéaire possédant de même une extrémité Muc C-terminale libre et deux liaisons oxime (Figure 49).

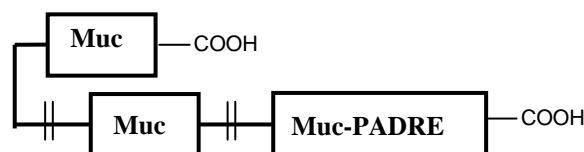


Figure 49 : Conception d'une nouvelle chimère linéaire

## IV . 2 . Synthèse des chimères

La synthèse de chimères multimériques linéaires faisant partie d'un autre sujet de thèse actuellement préparé dans l'équipe, nous nous sommes intéressés dans cette partie à la synthèse des chimères branchées Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**) et (Muc)<sub>2</sub>Muc-PADRE (**51**). Ceci a été réalisé par deux stagiaires encadrés à la fin de ce travail de thèse.

La chimère Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**) qui diffère de la chimère (**1**) par l'ajout d'une unité Muc en position N-terminale du PADRE a été synthétisée exactement de la même façon que la chimère (**1**) à partir des synthons Muc(CHO)Acétal (**9**) et Aoa-Muc (**3**) précédemment synthétisés et du synthon Aoa-MucPADRE (**52**) (Schéma 93).

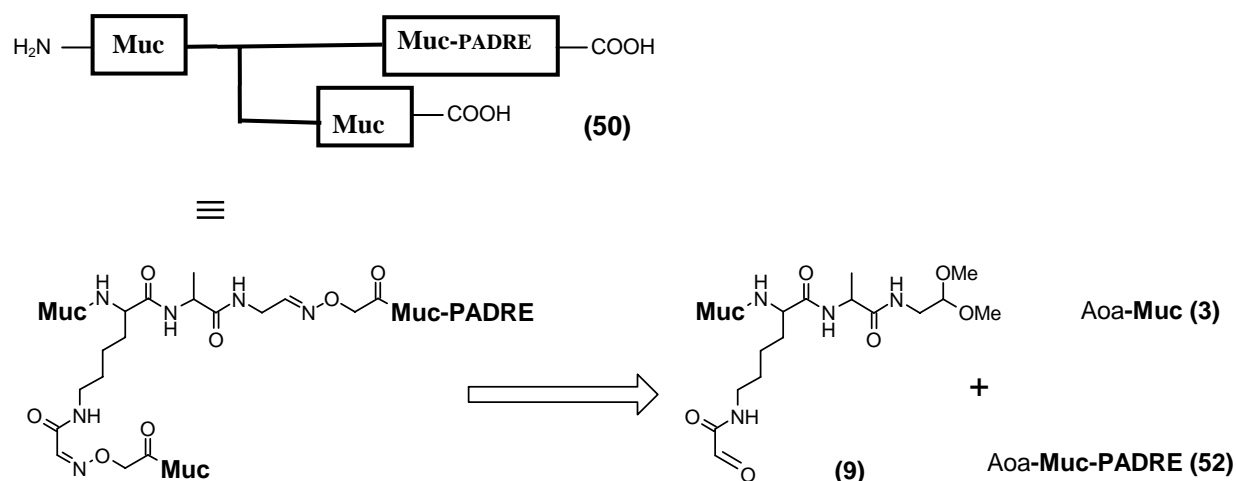


Schéma 93 : Schéma rétrosynthétique de la chimère Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**)

Tenant compte des résultats obtenus lors de l'optimisation de la synthèse du peptide PADRE, le synthon Aoa-Muc-PADRE (**52**) a été préparé sur une résine polaire, la résine PEGA, sur laquelle le bras Rink a été couplé. Lors de l'élongation de la séquence Muc-PADRE, le dipeptide Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\psi^{\text{Me, Me}}$  Pro)-OH a été introduit à la place des résidus W<sup>7</sup>T<sup>8</sup> du PADRE<sup>144</sup>. Le résidu Boc-Aoa-OH a ensuite été couplé manuellement sur le peptide-résine Muc-PADRE-Rink-PEGA.

La chimère (Muc)<sub>2</sub>Muc-PADRE (**51**) où les trois modules sont fixés par leur extrémité N-terminale peut être obtenue par ligation de deux synthons Aoa-Muc (**3**) sur un nouveau

synthon CHO(CHO)Muc-PADRE (**53**) possédant deux fonctions aldéhydes branchées en position N-terminale (Schéma 94).

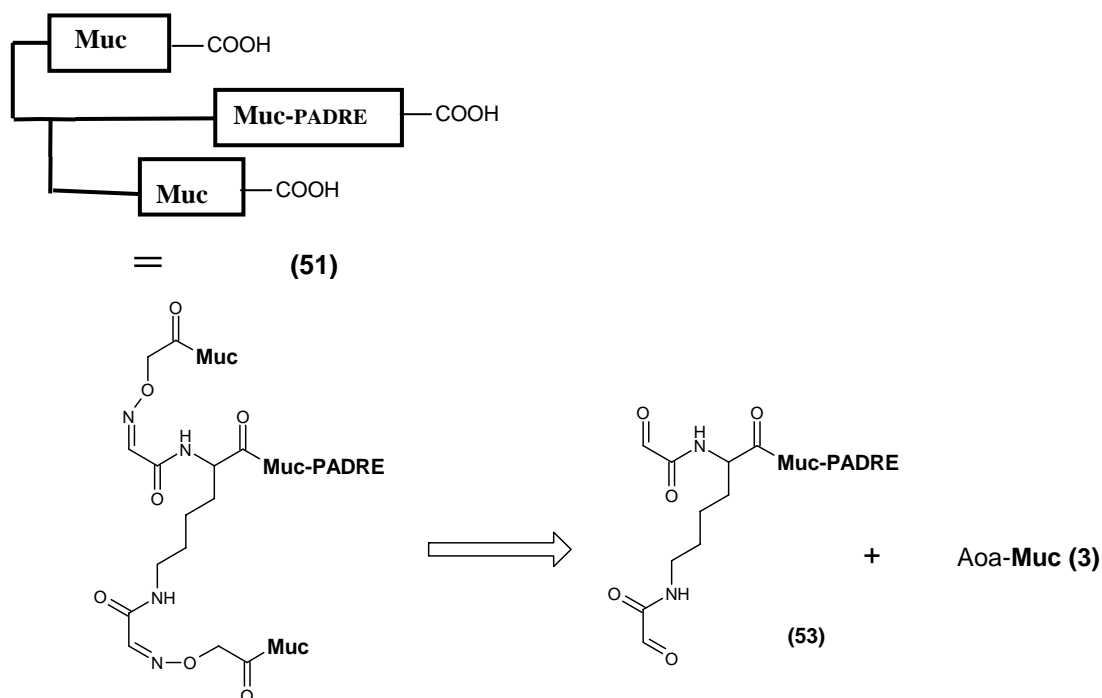


Schéma 94 : Schéma rétrosynthétique de la chimère (**51**)

Le synthon CHO(CHO)Muc-PADRE (**53**) a été préparé à partir du peptide-résine Muc-PADRE-Rink-PEGA sur lequel un résidu Fmoc-Lys(Mtt)-OH a été couplé. Après la déprotection des  $N^\alpha$  et  $N^\epsilon$  de la lysine N-terminale, deux sérines ont été couplées sur le  $N^\alpha$  et le  $N^\epsilon$ . Après le traitement TFA permettant de libérer le peptide de la résine et de déprotéger les chaînes latérales, le peptide a été précipité dans l'éther, filtré, séché et oxydé par  $\text{NaIO}_4$ . Le synthon CHO(CHO)Muc-PADRE (**53**) a ensuite été purifié par Sep-Pak® afin d'éliminer le formaldéhyde provenant de l'oxydation puis mis en solution avec 3 équivalents d'Aoa-Muc (**3**) afin d'obtenir la chimère (**51**).

En conclusion, la synthèse modulaire précédemment mise au point pour la synthèse des chimères Muc(Muc)PADRE (**1**) et PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**), nous a permis ici de synthétiser aisément deux nouvelles chimères. D'autres chimères, en particulier des chimères linéaires, peuvent être envisagées. Ceci devrait nous permettre lors de prochains essais d'immunisation de répondre aux questions soulevées lors des précédents essais quant au rôle joué par l'orientation des épitopes, le nombre d'unité Muc ou la géométrie des chimères.

## **V. Perspectives concernant la synthèse de nouvelles chimères incluant des liaisons hydrazide**

De même que la liaison oxime, la liaison hydrazone, représente l'avantage d'être stable à pH physiologique. Elle est cependant moins stable à pH acide et basique<sup>74</sup>. Cependant, contrairement à la liaison oxime<sup>175</sup>, elle est facilement réductible, ce qui permet d'obtenir une liaison hydrazide ou hydrazine plus stable. Contrairement à la liaison oxime ou hydrazone, la liaison hydrazine ou hydrazide ainsi obtenue ne présente plus l'isomérisie *cis / trans* de la double liaison et est donc plus flexible. En vu d'être utilisée pour la synthèse de vaccins synthétiques ceci a son importance puisque les produits obtenus seraient plus homogènes et plus flexible ce qui devrait permettre une meilleure immunogénicité.

Avant de pouvoir réaliser la synthèse de chimères triantennées contenant des liaisons hydrazide, obtenues après réduction de liaison hydrazone, il est nécessaire de mettre au point la synthèse du synthon hydrazide et les conditions de réaction pour la formation de l'hydrazone ainsi que la réduction de celle-ci. Ceci a été réalisé par des stagiaires encadrés pendant cette thèse.

### **V. 1 . Synthèse du peptide hydrazide**

#### **V. 1 . A . Stratégie de synthèse**

Les méthodes les plus couramment utilisées pour la synthèse de peptides hydrazide est l'acylation de l'extrémité N-terminale par un dérivé de l'acide  $\alpha$ -hydrazinoacétique<sup>95</sup>.

Ici nous souhaitons développer une méthode de synthèse permettant d'introduire une fonction hydrazide en position C-terminale. Celle-ci est basée sur de précédentes observations : Lors des premiers essais de synthèse du peptide résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5), nous avons constaté que le traitement avec l'hydrazine effectué alors pour déprotéger le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine protégé par un groupe Dde coupait partiellement le bras PAM sensible aux nucléophiles. Notre objectif a donc été de mettre à profit cette réaction secondaire, appelée hydrazinolyse, pour la rendre quantitative et obtenir ainsi un peptide hydrazide selon la réaction suivante (Schéma 95) :

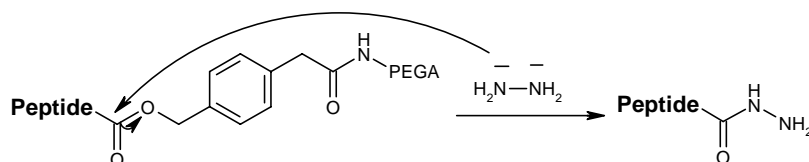


Schéma 95 : Réaction d'hydrazinolyse

En ce qui concerne les glycopeptides, cette méthode serait très avantageuse, puisqu'elle permettrait en une seule étape de déprotéger le glycopeptide de la résine sous forme d'hydrazide tout en éliminant les fonctions acétyles du groupement saccharidique.

### V . 1 . B . Mise au point des conditions d'hydrazinolyse

Afin de déterminer les conditions de réactions optimales, nous avons étudié l'hydrazinolyse d'un peptide-résine modèle Y-Muc-PAM-PEGA (**54**). La tyrosine possédant un noyau aromatique a été ajoutée afin de pouvoir quantifier par spectroscopie UV le peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) (Y-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-NH<sub>2</sub>) obtenu par hydrazinolyse.

Le peptide résine Fmoc-Y-Muc-PAM-PEGA (**56**) a facilement été obtenu à partir de l'acide aminé-résine A-PAM-PEGA (**6**) (Schéma 96). L'acide aminé C-terminal de la séquence Muc étant l'alanine, déjà couplée sur la résine, l'élongation a été réalisée avec les 19 acides aminés suivants. La résine a ensuite été divisée en plusieurs lots afin de tester différentes conditions de réaction d'hydrazinolyse. Pour chaque essai, le Fmoc a été éliminé par un traitement pipéridine et le dosage de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine donne la quantité initiale de peptide. Les chaînes latérales ont ensuite été déprotégées par un traitement TFA avant de réaliser le traitement d'hydrazinolyse.

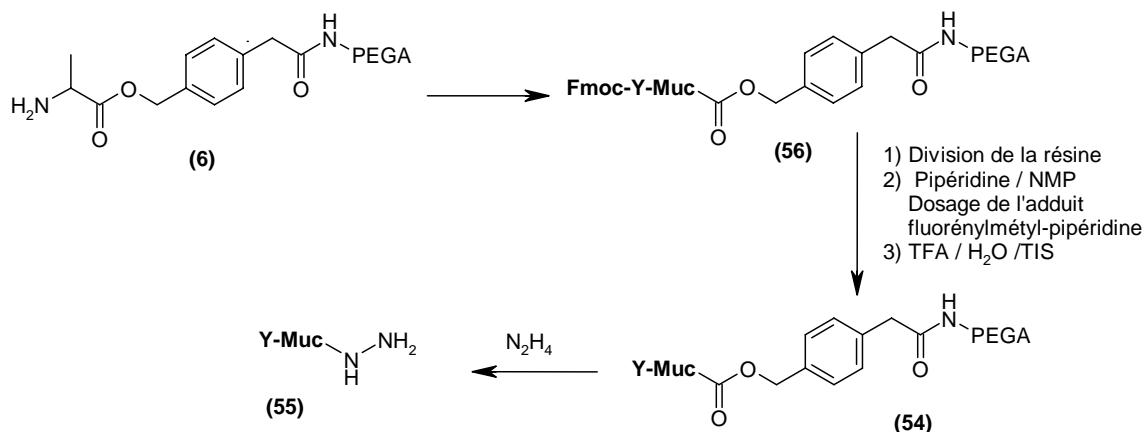


Schéma 96 : Synthèse du peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**)

Lors d'un premier essai avec une solution d'hydrazine à 20% dans l'eau, soit 10 fois supérieure à celle utilisée pour la déprotection du Dde, nous avons observé plusieurs produits secondaires identifiés par spectrométrie de masse comme des peptides tronqués côté C-terminal. Nous les avons attribués à des coupures du squelette peptidique par l'hydrazine (Figure 50). L'objectif a donc été donc d'adoucir les conditions de réaction afin de limiter ces réactions secondaires tout en conservant un bon rendement d'hydrazinolyse.

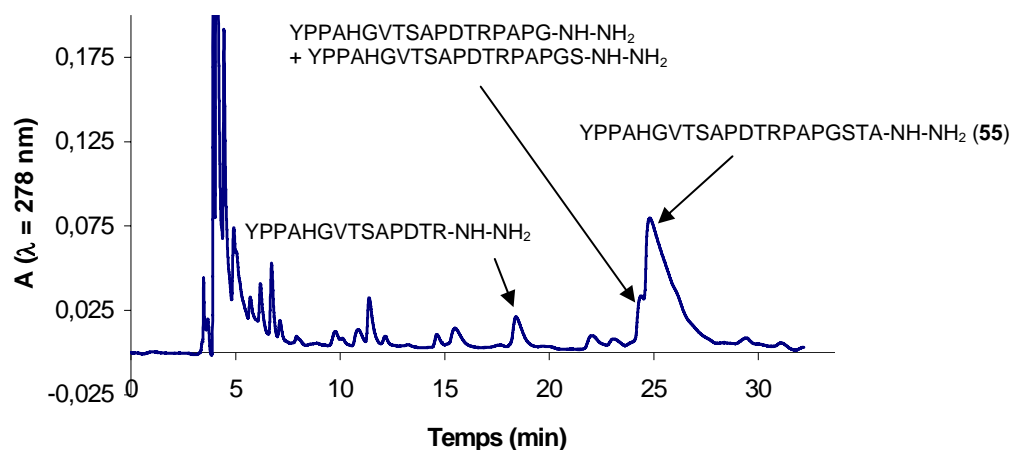


Figure 50 : Produits d'hydrazinolyse obtenu avec une solution d'hydrazine à 20%

Les différentes conditions (traitements A à F) qui ont été testées ainsi que les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5. Le rendement d'hydrazinolyse indique la quantité totale de peptides obtenus, déterminée par spectroscopie UV, par rapport à la quantité initiale de peptide-résine (**54**). La pureté indique la proportion du peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) par rapport aux produits secondaires. Le rendement total tient compte à la fois du rendement d'hydrazinolyse et de la pureté du produit.

Traitement	Concentration Hydrazine (%)	Temps de réaction (min)	Rendement d'hydrazinolyse (%)	Pureté (%)	Rendement total (%)
A	20	5	85,6	59,1	50,6
B	10	5	96,4	70,9	68,3
	10	5	89,7	62,8	56,3
C	10	2	94,5	65,1	61,5
D	10	1	76,5	55,3	42,3
E	5	5	77	61,6	47,4
F	2	5	15,8	67,6	10,7

Tableau 5 : Résultats d'hydrazinolyse du peptide-résine Y-Muc-PAM-PEGA (**54**) dans différentes conditions de réaction.

Excepté pour le traitement D, la diminution de la concentration en hydrazine (traitements B, C, E, F) par rapport au premier traitement réalisé avec une concentration en hydrazine de 20% (traitement A) permet de diminuer la formation des produits secondaires due à des coupures du squelette peptidique par l'hydrazine.

Une concentration de 5 % (Traitement E) ou 2 % (Traitement F) est cependant trop faible pour avoir un bon rendement d'hydrazinolyse. Une partie du peptide n'est en fait pas décroché de la résine. Ceci est particulièrement remarquable pour le traitement F où seulement 15% du peptide est décroché. De même une concentration de 10% avec un temps de réaction très court d'une minute (Traitement D) ne permet pas d'avoir un bon rendement d'hydrazinolyse. Dans ce cas, la faible pureté du produit est surprenante puisque *a priori*, si le rendement d'hydrazinolyse diminue, les réactions secondaires devraient également être moins importantes.

Les traitements B et C avec 10% d'hydrazine et des temps de réaction de 5 ou 2 min, représentent le meilleur compromis entre le rendement d'hydrazinolyse et la pureté du produit. Du fait des différences obtenues entre les deux essais avec le traitement B, il est difficile de déterminer lequel des traitements B et C est le plus approprié. Il aurait en fait fallu réaliser plusieurs essais avec chacun des traitements. Nous avons décidé d'utiliser pour la suite le traitement C avec un temps de réaction de 2 min afin de favoriser la pureté du produit plutôt que le rendement d'hydrazinolyse. Ceci pourrait éventuellement permettre d'utiliser directement les peptides obtenus pour la ligation sans purification. Un essai à une échelle plus importante a été réalisé dans ces conditions. Le rendement total avant purification tenant compte du rendement d'hydrazinolyse et de la pureté du produit est ici de 76 %. Cette réaction mise au point sur des petites quantités est donc tout à fait applicable sur des quantités plus importantes. Le peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) a ensuite été purifié par HPLC. Le rendement final calculé par rapport à la quantité de peptide-résine (**54**) est de 59 %. Tenant compte de la perte de produit inévitable lors de la purification ce dernier résultat est en accord avec le rendement total d'hydrazinolyse déterminé par spectroscopie UV.

## V. 2 . Mise au point des conditions de la formation de la liaison hydrazide avec différents partenaires aldéhyde et cétone

Dans la littérature, les différents exemples de liaison par une liaison hydrazone ou une liaison réduite hydrazide concernent la réaction d'un peptide cétoaldéhyde obtenu par oxydation d'une sérine *N*-terminal avec un peptide hydrazide ou semicarbazide. Ici nous souhaitons également vérifier la faisabilité de cette réaction avec un peptide méthylaldéhyde, obtenu par aminolyse, qui est employé dans notre stratégie de synthèse modulaire de peptides triantennés. Il serait également intéressant d'analyser les conditions de réaction avec un peptide cétone.

### V. 2 . A . Description des synthons utilisés

Le peptide hydrazide utilisé pour tester les conditions de réaction de la formation de la liaison hydrazone est le peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) précédemment décrit. Les peptides méthylaldéhyde, cétoaldéhyde et cétone utilisés dans cette étude sont décrits dans les deux paragraphes suivants.

#### V. 2 . A . a . Peptide cétone

Le peptide cétone PPAHGVTSAPDTRPAPGST-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CO-CH<sub>3</sub>, « Muc-CO-CO-CH<sub>3</sub> » (**56**) possédant une fonction  $\alpha$ -amido-méthyl-cétone en position C-terminale a été préparé selon la stratégie de synthèse mise au point au laboratoire<sup>176</sup>. Il s'agit d'utiliser la résine NovaTag®, récemment commercialisée, qui permet le marquage de peptide en position C- et N-terminale. Cette résine possède un bras acide 4-(3-formyl-2-methoxyphenoxy)-butanoïque substitué par l'éthylènediamine protégée par un groupement Mmt, très sensible en milieu acide (Figure 51).

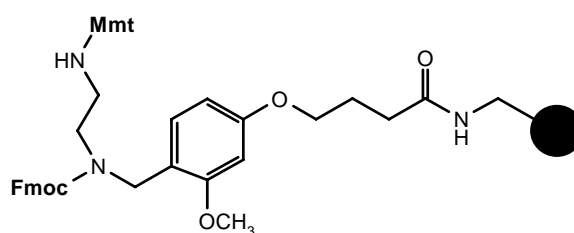


Figure 51 : Résine NovaTag®



Après l'élimination du Fmoc de cette résine, la synthèse du peptide Muc-CO-CO-CH<sub>3</sub> (**56**) (Schéma 97) consiste à réaliser l'élongation sur l'azote secondaire ainsi libéré. Du fait de l'encombrement stérique, il est indispensable de coupler le premier acide aminé avec HATU comme agent de couplage. Le dernier acide aminé est protégé par un Boc. Le Mmt est ensuite éliminé par un traitement avec HOBt 1M dans TFE/DCM, 1:1 pour permettre le couplage de l'acide pyruvique CH<sub>3</sub>-CO-COOH avec DCC/NHS comme agent de couplage. Le peptide est ensuite décroché de la résine en même temps que la déprotection des chaînes latérales par un traitement TFA. Il est important de noter que le TIS ne doit pas être utilisé lors de ce traitement. Celui-ci réduit en effet partiellement la fonction cétone en fonction alcool.

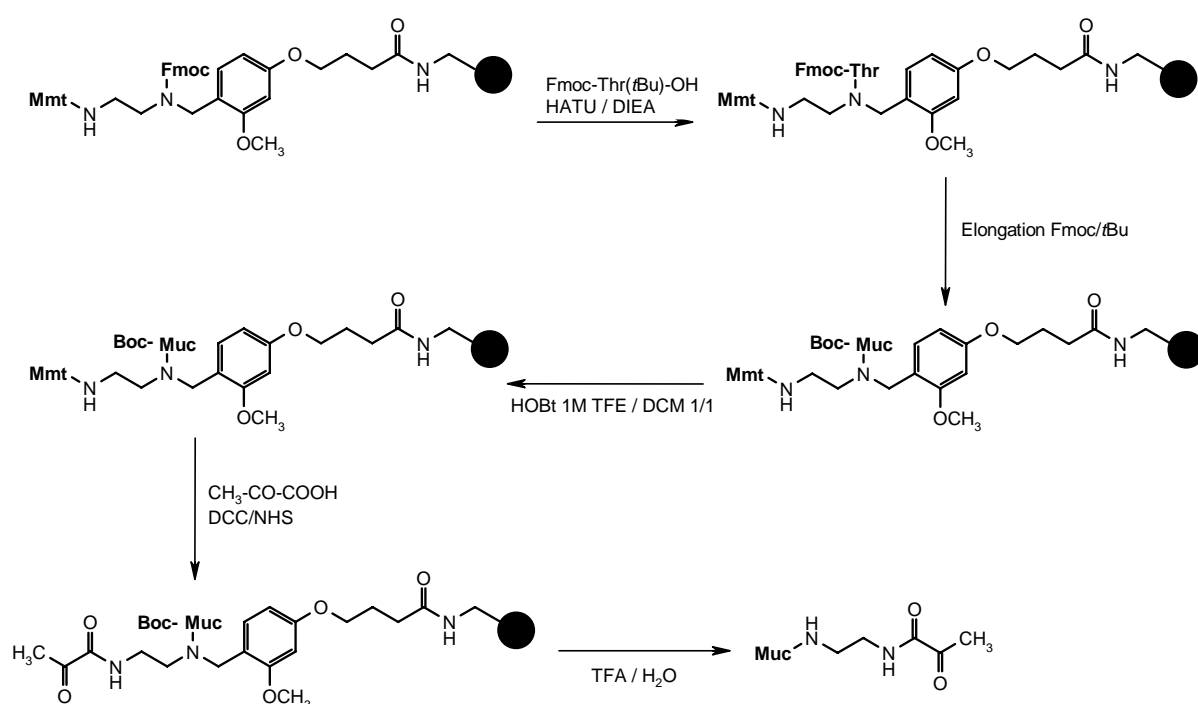


Schéma 97 : Synthèse du peptide cétone Muc-CO-CO-CH<sub>3</sub> (**56**)

### V. 2. A. b. Peptides aldéhyde

Le peptide acétal APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> « Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> » (**57**) a été obtenu par aminolyse du peptide-résine A-Muc-PAM-PEGA selon les conditions décrites précédemment. Un traitement TFA a ensuite permis de déprotéger l'acétal pour former le peptide méthylaldéhyde Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CHO (**58**).

Deux peptides cétoaldéhyde ont été préparés. Le peptide PPAHGVTSAPDTRPAPGST-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CHO, « Muc-CO-CHO » (**59**), possédant une fonction cétoaldéhyde côté C-terminal, a été préparé de la même façon que le

peptide Muc-CO-CO-CH<sub>3</sub> (**56**) en couplant une sérine à la place de l'acide pyruvique. Après le traitement TFA permettant de décrocher le peptide de la résine et de déprotéger les chaînes latérales, la sérine a été oxydée par NaIO<sub>4</sub>.

Le peptide CHO-CO-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA, « CHO-CO-Muc » (**60**), possédant cette fois la fonction cétoaldéhyde en position N-terminale a été obtenu à partir d'un peptide Muc préparé sur une résine Wang sur lequel une sérine a été couplée en position N-terminale. Après le traitement TFA permettant de décrocher le peptide de la résine et de déprotéger les chaînes latérales, la sérine a été oxydée par NaIO<sub>4</sub>.

## **V . 2 . B . Résultats des essais de ligation**

### **V . 2 . B . a . Ligation sur le méthylaldéhyde**

Ayant constaté précédemment que la ligation entre un peptide méthyl aldéhyde et un peptide aminoxy était instantanée, nous avons commencé à tester la formation de la liaison hydrazone entre le peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) et le peptide Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CHO (**58**). Malgré différents essais, à différents pH, avec et sans DMSO ou à différentes températures, ces facteurs étant connus<sup>74, 75</sup> pour influencer la vitesse de réaction, nous n'avons pas réussi à obtenir le produit de ligation. Ceci expliquerait pourquoi nous n'avons pas trouvé d'exemple de formation de liaison hydrazone avec méthylaldéhyde dans la littérature.

### **V . 2 . B . b . Ligation sur le peptide cétoaldéhyde**

Des essais de ligation entre le peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) et le cétoaldéhyde (**59**) à pH 5,5 ont montré, comme indiqué dans la littérature<sup>74</sup>, que l'ajout de DMSO dans le milieu réactionnel permet d'augmenter la vitesse de réaction. Celle-ci est en effet complète en 5 jours au lieu de 7, ce qui reste toutefois très lent.

Afin d'augmenter la vitesse de réaction, nous avons testé la réaction de ligation à un pH plus acide. En accord avec les résultats de Rose *et al*<sup>75</sup>, nous avons en effet déjà constaté une augmentation de la réactivité du cétoaldéhyde vis-à-vis d'un partenaire aminoxy en milieu acide. La réaction entre le peptide CHO-CO-Muc (**60**) et le peptide hydrazide (**55**) a donc été réalisée à pH 3 et 4 dans l'eau. La vitesse de réaction est effectivement nettement augmentée puisque dans les deux cas, le produit est déjà formé à 65% après 5h30 de réaction. Pour pouvoir observer une éventuelle différence entre la réaction à pH 4 et à pH 3, il aurait

fallu analyser le milieu réactionnel à des temps intermédiaires. Par contre, après 24h, la réaction n'évolue plus et la réaction n'est en fait effective qu'à 75 %. Ceci pourrait être dû à l'instabilité de la liaison hydrazone à ces pH<sup>74</sup> qui déplacerait l'équilibre vers les produits initiaux. Contrairement au cas de la liaison oxime, diminuer le pH afin d'augmenter la réactivité du cétoaldéhyde et la vitesse de réaction ne semble donc pas approprié dans le cas de la liaison hydrazone.

Lors d'un essai de purification par HPLC de l'hydrazone, nous avons constaté une dégradation complète de la liaison hydrazone pour redonner les produits de départ, ceci étant certainement dû à l'instabilité de la liaison dans les solvants utilisés. Afin d'obtenir un produit stable, le produit Y-Muc=Muc (**61**) obtenu lors de la ligation entre le peptide CHO-CO-Muc (**59**) et le peptide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) a été réduit par NaBH<sub>3</sub>CN directement dans le milieu réactionnel. La réduction est effective en 3 heures.

Ces résultats confirment les études déjà réalisées sur la stabilité et la réactivité de la liaison hydrazone et nous ont permis de mieux maîtriser cette ligation.

### **V . 2 . B . c . Ligation sur le peptide cétone**

Ayant constaté une différence de réactivité entre un peptide aldéhyde et un peptide cétoaldéhyde vis-à-vis d'un peptide hydrazide, nous avons voulu tester la réactivité d'un peptide cétone.

La ligation entre les peptides Muc-CO-CO-CH<sub>3</sub> (**56**) et Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) pour former le produit Y-Muc=(CH<sub>3</sub>)Muc (**62**) a été testée dans deux conditions à pH 5,5 dans DMSO/H<sub>2</sub>O ou dans l'eau à pH3. De même que pour le cétoaldéhyde, la réaction est totale en présence de DMSO en 5 jours. De plus, la réaction est également totale au bout de 5 jours à pH3, ce qui semblerait indiquer une augmentation de la stabilité de la liaison hydrazone obtenue par ligation entre une cétone et un hydrazide par rapport à celle obtenue par ligation entre un cétoaldéhyde et un hydrazide.

Il serait ensuite intéressant de tester la réduction de cette liaison. Etant plus stable que la liaison hydrazone obtenue avec un cétoaldéhyde, il est probable que cette liaison soit plus difficile à réduire.

## V. 2. B. d. Hypothèses sur les différences de réactivité

Les résultats préliminaires décrits ci-dessus nous ont permis de tester la réactivité de peptides méthyl- ou cétoaldéhyde et de peptide cétone vis-à-vis d'un peptide hydrazide pour former une hydrazone. La réaction avec un cétoaldéhyde ou une cétone est effective alors qu'aucune réaction de ligation n'a pu être observée dans le cas d'un méthylaldéhyde et ce, quelles que soient les conditions de réaction.

Ces résultats sont contraires à ceux obtenus avec un peptide aminoxy. Nous avons en effet déjà observé que, dans ce cas, le méthylaldéhyde était beaucoup plus réactif que le cétoaldéhyde. Ceci a été confirmé par une autre étude menée lors d'un travail de thèse au laboratoire<sup>177</sup> qui a également montré qu'une cétone était encore moins réactive (Figure 52).

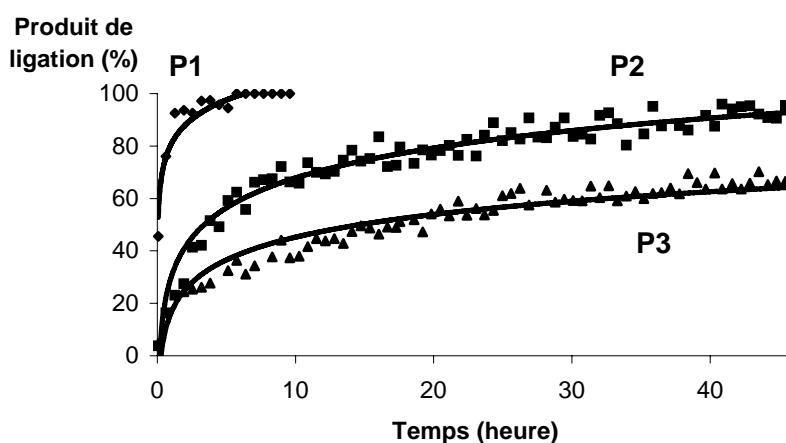


Figure 52 : Réaction d'un peptide aminoxy avec un peptide méthylaldéhyde (P1), un peptide cétoaldéhyde (P2) et un peptide cétone (P3) (d'après C. Buré<sup>177</sup>)

Afin de comprendre cette différence de réactivité entre les partenaires cétone ou aldéhyde et les partenaires hydrazide ou aminoxy, nous nous sommes appuyés sur l'étude du mécanisme de ces réactions réalisées par Jenks<sup>178</sup>, Sayer *et al.*<sup>179</sup> et Chenevriér *et al.*<sup>180</sup>.

La formation d'oxime ou d'hydrazone s'effectue en deux étapes : une étape d'addition nucléophile pour former une carbinolamine et une étape de déshydratation (Schéma 98).

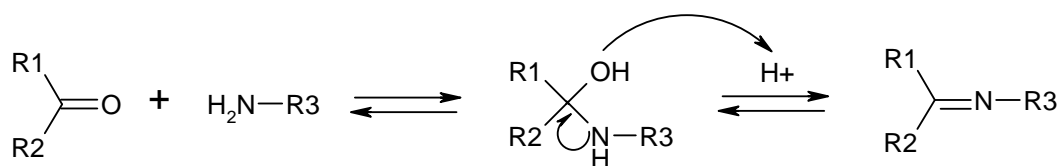
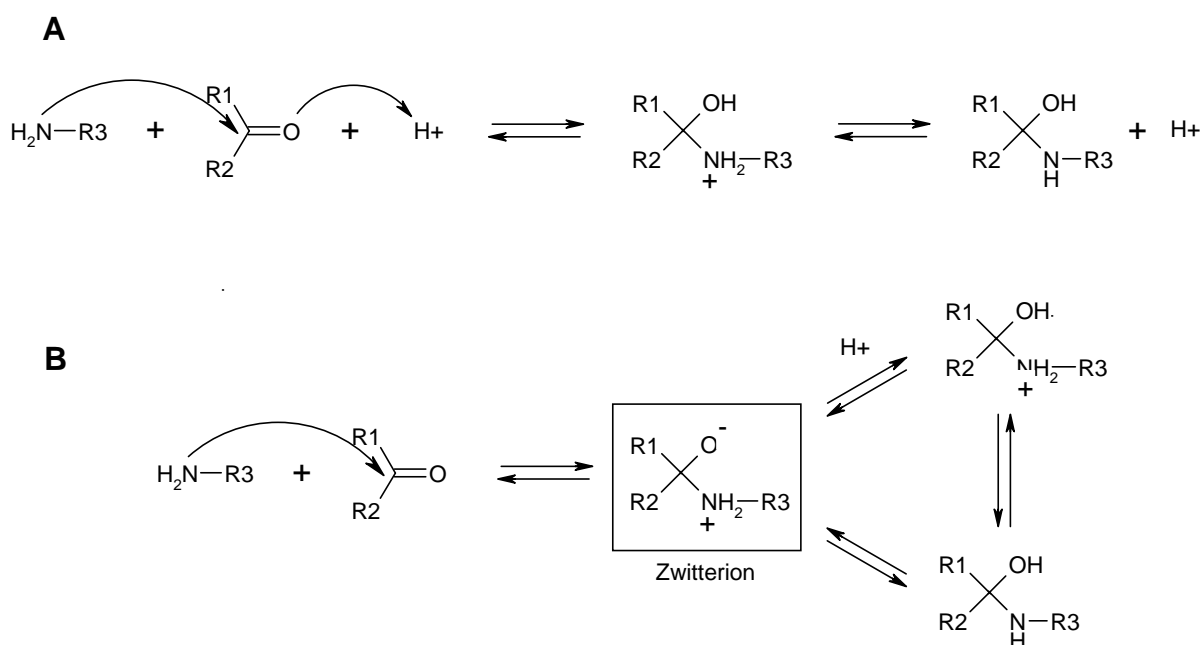


Schéma 98 : Mécanisme de formation d'une liaison oxime ou hydrazone.

Jenks<sup>178</sup> a mis en évidence qu'à pH neutre l'étape limitante d'une telle réaction est l'étape de déshydratation. Sayer *et al.*<sup>179</sup> ont quant à eux étudié ce type de réaction en milieu acide et en particulier la formation de la carbinolamine. Suivant la basicité de l'amine nucléophile, cette réaction peut se faire suivant deux mécanismes, un mécanisme concerté (Schéma 99A) où l'attaque nucléophile de l'amine sur le carbonyle a lieu en même temps que l'activation de celui-ci par un proton ou un mécanisme par étape qui implique la formation d'un zwitterion (Schéma 99B).



**Schéma 99** : Formation de la carbinolamine  
A : mécanisme concerté, B : mécanisme par étape

D'après l'étude de Sayer *et al.*<sup>179</sup>, dans le cas d'une base faible telle que l'hydrazide, le zwitterion est particulièrement instable, le mécanisme concerté est donc favorisé. En accord avec l'étude de Jenks<sup>178</sup>, ces auteurs ont montré qu'à pH neutre l'étape limitante est l'étape de déshydratation de la carbinolamine. Par contre, à pH plus acide, l'étape limitante est l'attaque nucléophile de l'amine sur le carbonyle catalysée en milieu acide. Au pH où nous avons effectué les réactions de ligation (pH 5,5), l'étape limitante serait donc l'attaque nucléophile. L'introduction de groupes électroattracteurs en  $\alpha$  du carbonyle dans le cas du peptide cétone ou des peptides cétoaldéhyde rendrait le carbonyle plus électrophile ce qui favoriserait la réaction. Dans le cas du peptide méthylaldéhyde, le carbonyle ne serait pas assez électrophile pour pouvoir subir une attaque nucléophile par une base trop faible telle que l'hydrazide.

Dans le cas d'une base plus forte telle que l'aminooxy, le zwitterion est plus stable et les deux mécanismes peuvent coexister. A pH très faible, le mécanisme concerté prédomine, à pH légèrement plus élevé, l'étape limitante est la formation du zwitterion, à pH moyennement acide, les étapes qui prédominent concernent la protonation de l'oxygène du zwitterion, à pH proche de la neutralité, l'étape limitante est de nouveau l'étape de déshydratation. Au pH auquel ont été effectuées les réactions de ligation (pH 4,6), les étapes limitantes seraient la protonation de l'oxygène du zwitterion. Dans le cas du peptide cétoaldéhyde, le groupement électroattracteur en  $\alpha$  du carbonyle stabiliserait la charge négative de l'oxygène, ce qui pourrait expliquer que la réaction soit plus lente que dans le cas du méthylaldéhyde. En ce qui concerne le peptide cétone, la faible réactivité pourrait être due à l'encombrement stérique qui défavoriserait l'addition nucléophile, rendant cette étape limitante.

### V.3. Synthèse d'une chimère branchée avec des liaisons hydrazides

Les résultats concernant la synthèse d'un peptide hydrazide ainsi que les résultats préliminaires concernant la formation de la liaison hydrazone avec un peptide méthylaldéhyde, cétoaldéhyde ou un peptide cétone, nous permettent maintenant d'envisager la synthèse de nouvelles chimères branchées basée sur le même type de stratégie qu'avec les liaisons oxime mais incluant cette fois des liaisons hydrazone qui pourront être réduites.

La synthèse d'une telle chimère contenant des liaisons hydrazone pourrait être réalisée de la même façon que les chimères Muc(Muc)PADRE (**1**) ou PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) à partir des peptides dialdéhydes masqués Muc(Ser)Acétal (**4**) ou PADRE-Muc(Ser)Acétal, obtenus par aminolyse des peptide-résines A-Muc-K(S)-PAM-PEGA (**5**) ou PADRE-Muc-K(S)-PAM-PEGA, en remplaçant les synthons aminooxy par des synthons hydrazide.

Les synthons Muc(Ser)Acétal (**4**) ou PADRE-Muc(Ser)Acétal (**40**) ne sont en fait pas appropriés pour la synthèse de chimères contenant des liaisons hydrazone puisque l'aldéhyde obtenu après déprotection de l'acétal est un méthylaldéhyde alors que nous avons vu que la ligation entre un peptide hydrazide et un méthylaldéhyde n'est pas effective. Par contre, à partir des mêmes peptide-résines A-Muc-K(S)-PAM-PEGA (**5**) ou PADRE-Muc-K(S)-PAM-PEGA, il est possible de réaliser une hydrazinolyse afin d'obtenir les synthons A-Muc-K(S)-NH-NH<sub>2</sub> (**63**) ou PADRE-Muc-K(S)-NH-NH<sub>2</sub> (**64**). Un peptide cétoaldéhyde pourra alors être condensé sur l'hydrazide avant de réaliser une deuxième ligation sur la sérine oxydée.

Le synthon contenant l'épitope PADRE étant vraisemblablement inséparable des produits de ligation, celui-ci, doit être introduit sous forme de partenaire aldéhyde qui est en défaut dans la réaction de ligation. La chimère que nous souhaitons synthétiser est donc la chimère Muc(HzMuc)HzMucPADRE (**65**) obtenue à partir des synthons Muc-K(S)-NH-NH<sub>2</sub> (**63**), CHO-CO-Muc-PADRE (**66**) et Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**67**) (Schéma 100).

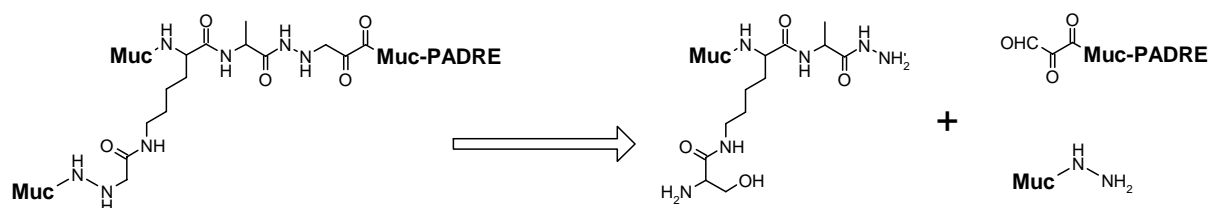


Schéma 100 : Schéma rétrosynthétique de la chimère contenant des liaisons hydrazide

## **Conclusions et perspectives**



L'immunothérapie active est l'une des nouvelles approches mises en œuvre pour la lutte contre le cancer. La glycoprotéine MUC1, surexprimée à la surface des cellules cancéreuses et dont des antigènes tumoraux peptidiques et saccharidiques ont été identifiés, est un bon modèle pour le développement d'une telle approche. Des constructions immunogènes possédant ces déterminants peptidiques ou saccharidiques ont été développées, mais très peu d'exemples existent concernant la construction d'immunogènes possédant ces deux types de déterminants, ceci s'expliquant sans doute par le fait que la synthèse de glycoprotéines n'en est elle-même qu'à ses balbutiements. Dans ce contexte, l'objectif du travail qui a été présenté ici était la mise au point d'une méthode robuste de synthèse de petites protéines modulaires glycosylées afin de développer des constructions glycoprotéiques originales capables d'induire une réponse humorale contre MUC1 tumorale.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la synthèse par ligation chimique d'une petite protéine modulaire triantennée comportant deux unités de répétition de la protéine MUC1 et l'épitope T-auxiliaire universel PADRE liés par des liaisons oxime. Les essais d'immunisation ont pu montrer l'influence à la fois de la géométrie branchée et de l'introduction d'un épitope T-auxiliaire sur l'immunogénicité de telles chimères.

Cette méthodologie a ensuite été appliquée à la synthèse de chimères glycosylées. Si la synthèses de glycopeptides analogues de MUC1 portant les épitopes saccharidiques Tn, T, Sialyl-Tn ou Sialyl T ont déjà été réalisées, ceci est la première synthèse de constructions glycoprotéiques branchées analogues de MUC1 portant les épitopes saccharidiques Tn et T et un épitope T-auxiliaire dont l'immunogénicité a été montrée. La stratégie de synthèse modulaire a permis de façon très enrichissante d'étudier et de comparer l'influence de ces deux épitopes saccharidiques sur l'immunogénicité de nos constructions, ceci ayant été réalisé jusqu'à présent, dans le cas d'immunogènes analogues de MUC1, uniquement avec l'épitope saccharidique Tn. De façon inattendue, les anticorps induits par le glycopeptide MucT se comportent différemment des anticorps induits par le glycopeptide MucTn. Accompagnées d'études complémentaires pour confirmer et comprendre plus en détail le rôle de ces épitopes saccharidiques sur l'immunogénicité de nos chimères et la spécificité des anticorps produits, ces résultats pourraient enrichir les connaissances sur la réponse immunitaire induites par les glycopeptides.

La géométrie des constructions ayant montré son importance, notre stratégie modulaire a été mise en oeuvre pour la synthèse de nouvelles chimères de constructions différentes. Le

remplacement de la liaison oxime par une liaison hydrazide plus flexible pourra également être étudié. Ceci permettra alors de déterminer la construction la plus immunogène.

En vu de nouveaux essais concernant d'autres chimères glycosylées, il semble en effet indispensable d'avoir entre nos mains la construction la plus immunogène possible. De nombreux développements pourront alors être envisagés. Des saccharides plus complexes pourront être introduits dans les chimères. Les antigènes tumoraux étant souvent sialylés, l'introduction d'un tel groupement saccharidique dans une construction immunogène semble particulièrement séduisante. Si l'approche utilisant des thréonines glycosylées est limitée à des groupements saccharidiques simples, des groupements saccharidiques supplémentaires peuvent être greffés sur les premiers saccharidiques par voie enzymatique. Les groupements sialyles, particulièrement sensibles, pourraient ainsi être introduits sur les différentes constructions, une fois celles-ci assemblées. Il serait également très intéressant d'introduire les groupements saccharidiques sur d'autres thréonines ou sérines de la chaîne peptidique voire sur toutes les positions simultanément afin d'imiter l'effet de cluster présent dans la mucine tumorale.

Le travail réalisé pendant cette thèse a fait l'objet d'une publication, une communication par affiche et deux communications orales :

Synthesis of branched oxime-linked peptide mimetics of the MUC1 containing a universal T-helper epitope. G-A. Cremer, N. Bureaud, D. Lelièvre, V. Piller, F. Piller, A. Delmas. 2004. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 6353-6360.

Synthèse modulaire de glycoprotéines immunogènes analogues de MUC1. G-A. Cremer, N. Bureaud, D. Lelièvre, V. Piller, F. Piller, A. Delmas. *Communication orale au congrès Eurochem 2005 de la SFC, Nancy, Aout 2005.*

Nouvelle approche anti-tumorale : Synthèse d'analogues triantennés de Muc1 par ligation chimioselective. G-A. Cremer, N. Bureaud, D. Lelièvre, V. Piller, F. Piller, A. Delmas. *Communication orale (Janvier 2005, Aussois) et par affiche (Octobre 2003, Anglet) aux congrès du Groupe Français des Peptides et Protéines.*

Cinq stagiaires ont été encadrés pendant cette thèse et ont contribué à ce projet :

Aline Corteggiani. BTS de chimie, Ecole Nationale de Chimie Physique Biologie. Synthèse sur support solide d'un peptide aldéhyde et ligation chimique. Juin-Juillet 2003

Cindy Montembault. IUT de chimie, Orsay. Synthèse par hydrazinolyse d'un peptide hydrazide. Mai-Juillet 2004

Hanane Tariq. Master 2 chimie organique et analytique, Université d'Orléans. Synthèse d'une chimère contenant une liaison hydrazone. Octobre 2004-Juin 2005.

Vincent Réau. IUT de chimie, Orsay. Synthèse d'analogues linéaires de MUC1 par ligation chimique. Mai-Juin 2005.

Aurélié Guérin. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes. Synthèse d'analogues branchés de MUC1 par ligation chimique. Mai-Juillet 2005.

# **Partie expérimentale**

## **I . Méthodes générales**

### **I . 1 . Provenance des produits**

Les solvants (Ether diéthylique, NMP, MeOH, CH<sub>3</sub>CN, THF, DCM, Toluène) proviennent de chez Carlo Erba ou SDS. DCM, MeOH, CH<sub>3</sub>CN et le toluène utilisés pour les réactions effectuées en milieu anhydre ont été distillés sur CaCl<sub>2</sub> ou Mg. L'éther diéthylique utilisé pour la précipitation des peptides aminooxy est celui de meilleure qualité (> 99.5) de chez Acros. Le DMF et HATU proviennent d'Applied Biosystems. DIEA, TFA et la pipéridine sont de chez SDS. Ac<sub>2</sub>O et HOBt sont de chez Fluka. HBTU, le bras acide p-{(R,S)-a-[1-(9H-Fluoren-9-nyl)-methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl}phenoxyacétique et les différentes résines proviennent de chez Novabiochem. Le bras acide Boc-Ala-4-(oxymethyl)-phenylacétique provient de chez Neosystem. Les acides aminés sont de chez Novabiochem ou Senn Chemicals. Le Boc-Aoa a été préparé selon le mode opératoire décrit par Offord *et al.*<sup>175b</sup> à partir de l'Aoa qui provient de chez Acros. Les autres réactifs proviennent de chez Acros ou Aldrich. Les colonnes Sep-Pak® C18 proviennent de chez Waters.

L'adjuvant Imject®Alum provient de chez Pierce. L'adjuvant incomplet de Freund et ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium) proviennent de chez Sigma. Les anticorps de chèvre anti Ig de souris couplés à la peroxydase sont de chez Biorad. Les plaques de microtitration proviennent de chez Max-Sorp NUNC. Les souris consanguines C57Bl6 ont été élevées au laboratoire. Les souris de sexe féminin sont âgées de 2 à trois mois au moment des immunisations.

### **I . 2 . HPLC**

Les analyses et les purifications HPLC ont été effectuées en phase inverse avec une pompe Merck-Hitachi L7100 équipée avec des colonnes C18 (nucléosil, 300 Å, 5 µm, 250 x 4,6 mm ou 250 x 10,5 mm) ou une colonne C4 (Vydac, 300 Å, 250 x 10,5mm), un détecteur à barrette de diode Merck-Hitachi L-7455 et une interface Merck-Hitachi D-7000. Les peptides ont été élués avec un gradient linéaire de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/0,1% TFA. Les solvants A et B contiennent respectivement de l'eau avec 0,1% de TFA et de l'acétonitrile avec 0,1% de TFA. Gradient A : 10 à 60% de B pendant 80 min. Gradient B : 10% de B pendant 10 min puis 10 à 60% de B pendant 80 min. Gradient C : 15% de B pendant 6 min puis 15 à 27% de

B pendant 30 min. Gradient D : 25% de B pendant 5 min puis 25 à 75% de B pendant 80 min. Gradient E : 45 à 65% de B pendant 20 min. Gradient F : 12 à 23% de B pendant 40 min. L'élution a été suivie à 214 nm.

### **I . 3 . Spectrométrie de masse**

Les analyses de spectrométrie de masse par électrospray ont été effectuées sur un triple quadripôle ( Quatro II, Micromass, Manchester, UK). La masse indiquée est la masse moyenne recalculée à partir des ions chargés.

Les analyse Maldi-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Life) ont été effectués sur un Autoflex (Bruker). La masse indiquée est la masse monoisotopique.

Les composés (20) et (21) et (24) à (38) ont été analysés par FD (Field Desorption) sur un appareil Finnigan MAT 95. La masse indiquée est la masse monoisotopique

### **I . 4 . Procédure générale pour la synthèse peptidique en phase solide automatisée**

Les synthèses peptidiques en phase solide ont été réalisées avec un synthétiseur 433A (Applied Biosystems) en utilisant la stratégie Fmoc/*t*Bu sur une échelle de 0,1 mmoles avec 10 équivalent d'HBTU/HOBt comme agent de couplage, 10 équivalents de Fmoc-Aminoacides et 12 équivalents de base. Les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés sont Lys(Boc), Asp(*t*Bu), Ser(*t*Bu), Thr(*t*Bu), Arg(Pbf), Trp(Boc), His(Trt). Le programme utilisé, fourni par le constructeur, consiste en un simple couplage suivi par une acétylation avec de l'anhydride acétique.

### **I . 5 . Procédure générale pour les couplages manuels**

Les couplages manuels ont été effectués selon la méthode de neutralisation *in situ* décrite pour la stratégie Fmoc<sup>146</sup>. L'acide qui doit être activé (5 équivalents) et HBTU (5 équivalents) sont dissous dans du DMF. La solution est transférée sur la résine (1 équivalent) placée dans une seringue équipée d'un fritté. Après 5 min d'agitation, 6 équivalents de DIEA sont ajoutés. Après 4h d'agitation, les réactifs sont éliminés par filtration et la résine est rincée avec du DMF.

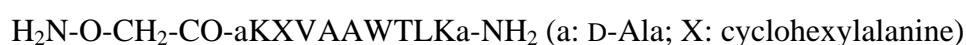
## **II . Synthèse des chimères non glycosylées**

Les modes opératoires des molécules décrites dans la partie II des « Résultats et Discussion » sont décrits dans cette partie ainsi que les essais d'immunisation réalisés avec ces molécules

### **II . 1 . Synthèse de la chimère Muc(Muc)PADRE (1)**

#### **II . 1 . A . Synthèse des synthons Aoa-PADRE (2) et Aoa-Muc (3)**

##### **Aoa-PADRE (2)**



L'acide 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxy acétique (250 mg ; 0,46 mmoles) a été couplé manuellement sur une résine NovaSyn® TG (227 mg ; substitution : 0,44 mmoles/g) 2 x 8 h. L'élongation a ensuite été réalisée selon la procédure générale avec un rendement de 91%. Le peptide-résine (110 mg ; 0,021 mmoles) a été introduit dans une seringue équipée d'un fritté. Le Boc-Aoa-OH (20 mg ; 0,107 mmoles) a été couplé manuellement selon la procédure générale avec HATU (38 mg ; 0,107 mmoles) au lieu de HBTU. Le peptide résine (40 mg) a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 95:2,5:2,5 (1 ml). Le peptide a ensuite été précipité et lavé avec de l'éther. 11 mg (rendement quantitatif) de produit brut ont ainsi été obtenus.

*Tr* (gradient B): 47,58 min; ESI-MS: 1354,10 ± 0,19 [M] (calculé pour C<sub>64</sub>H<sub>107</sub>N<sub>17</sub>O<sub>15</sub>, [M] = 1354,66).

##### **Aoa-Muc (3)**



Le composé Aoa-Muc (3) a été préparé avec une résine Fmoc-Ala-Wang (250 mg, substitution : 0,44 mmoles/g). L'élongation a été réalisée selon la procédure générale avec un rendement de 95%. Le peptide-résine (240 mg ; 0,052 mmoles) a été introduit dans une seringue équipée d'un fritté et le Boc-Aoa-OH (49,7 mg ; 0,26 mmoles) a été couplé manuellement selon la procédure générale en utilisant HATU (99 mg ; 0,26 mmoles) au lieu de HBTU. Le peptide-résine (41 mg) a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec

TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2,5:2,5 (1 ml). Le peptide a ensuite été précipité et lavé avec de l'éther. 14 mg (87%) de produit brut ont ainsi été obtenus.

*Tr* (gradient A): 14,57 min; ESI-MS: 1959,51 ± 0.06 [M] (calculé pour C<sub>82</sub>H<sub>130</sub>N<sub>26</sub>O<sub>30</sub>, [M] = 1960,09).

## **II. 1. B. Synthèse du synthon Muc(CHO)Acétal (9)**

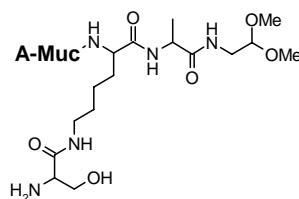
### **Muc(Ser)PAM-PEGA (5)**

APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAK(S)A-PAM-PEGA

L'acide Boc-Ala-4-(oxyméthyl)phénylacétique (**7**) (168,7 mg ; 0,5 mmoles) a été couplé manuellement à la résine aminométhyl-PEGA (substitution : 0,4 mmoles/g ; 2 g de résine humide) selon la procédure générale. La résine a ensuite été acétylée avec DMF/Ac<sub>2</sub>O/DIEA 2:2:1 (3 ml), 2 x 10 min, puis déprotégée avec TFA/DCM, 5:5 pendant 30 min et neutralisée avec DIEA/NMP, 2:8. L'acide-aminé-résine (**6**) ainsi obtenu a été introduit dans un réacteur pour synthèse en phase solide. L'élongation de la séquence A-Muc-K a alors été conduite comme décrit dans la procédure générale. La lysine a été introduite sous forme de Fmoc-Lys(Mtt)-OH. L'adduit fluorénylméthyl-piperidine formé lors de l'élimination du Fmoc du premier acide aminé a été dosé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) pour donner la quantité initiale d'amines disponibles (0,076 mmoles). L'acide aminé N-terminal a été introduit sous la forme Boc-Ala-OH. Après l'élongation, le peptide-résine (188 mg ; 0,025 mmoles) a été introduit dans une seringue équipée d'un fritté puis traité avec TFA/DCM/TIS, 1:98:2 (~30 x 2 min, 2 ml, jusqu'à ce que la résine soit incolore). Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (47,9 mg ; 0,125 mmoles) a ensuite été couplé manuellement au peptide-résine selon la procédure générale. Après 3 lavages à la NMP, le Fmoc a été éliminé par un traitement 20% de pipéridine dans la NMP (1,5 ml), 3 x 5 min, suivi par un lavage de la résine avec du DCM (3x). L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) donnant 0,021 mmoles. Le rendement total (élongation et couplage de la sérine) est donc de 85% en partant de la quantité initiale d'amines. Après lavage de la résine avec du DCM (3x), le  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> et les chaînes latérales ont été déprotégées par un traitement TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2.5:2.5 pendant 2 h. La résine a ensuite été lavée avec du DCM (3x) et de la NMP (3x) puis neutralisée avec DIEA/NMP 1:9 (3 ml), 3 x 5 min.



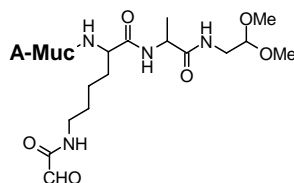
### Muc(Ser)Acétal (4)



Le peptide-résine Muc(Ser)PAM-PEGA (5) a été lavé avec du DMF (3x). 3,2 ml d'acétaldéhyde-diméthylacétal et 1,6 ml de DMF ont alors été ajoutés au peptide-résine. Le milieu a été maintenu à 40°C pendant 18h sous agitation lente puis filtré et la résine a été lavée avec du DMF (3 x 5min) et de l'eau (3 x 5min). L'ensemble des filtrats a été rassemblé et évaporé sous vide. Le résidu a ensuite été solubilisé dans 12 ml d'eau. 1,2 ml de pipéridine ont alors été ajoutés. La solution a été agitée pendant 90 min puis évaporée sous vide. Le produit Muc(Ser)Acétal (4) ainsi obtenu a été solubilisé dans 12 ml d'eau puis analysé par HPLC.

*Tr* (gradient A): 14,66 min; ESI-MS : 2330,17 ± 0,66 [M] (calculé pour C<sub>99</sub>H<sub>163</sub>N<sub>31</sub>O<sub>34</sub>, [M] = 2331,57).

### Muc(CHO)acétal (9)

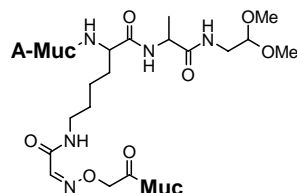


NaIO<sub>4</sub> (6,05 mg ; 0,028 mmoles) a été ajouté à la solution de Muc(Ser)acétal (4) (0,014 mmoles) dans un tampon phosphate 0,1M pH 6,5 (8 ml). Après 10 minutes d'agitation, l'éthane-diol (3,2 µl ; 0,056 mmoles) a été additionné pour stopper la réaction. Le peptide a ensuite été semi-purifié par filtration sur une colonne Sep-Pak® C18 préalablement conditionné par un lavage avec CH<sub>3</sub>CN et H<sub>2</sub>O et abondamment lavé avec H<sub>2</sub>O avant l'élution du peptide avec H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN ; 50:50. Après évaporation sous vide, Muc(CHO)Acétal (9) a été dissout dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 (4,8 ml) et analysé par HPLC.

*Tr* (gradient A): 16,08 min; ESI-MS: 2300,27 ± 1.09 [M] (calculé pour C<sub>98</sub>H<sub>158</sub>N<sub>30</sub>O<sub>34</sub>, [M] = 2300,51).

## II. 1. C. Ligations

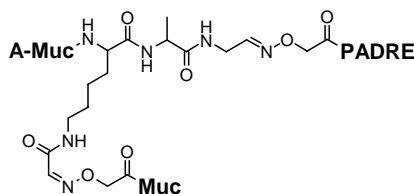
### Muc(Muc)Acétal (10)



Aoa-Muc (**3**) (30 mg ; 0,015 mmoles) a été ajouté à la solution de Muc(CHO)Acétal (**9**) et le mélange réactionnel a été agité pendant 20 h. Muc(Muc)Acétal (**10**) a ensuite été purifié par HPLC. Les fractions ont été collectées dans un bain de glace puis évaporées et lyophilisées en présence de Aoa-PADRE (**2**) (3,3 mg ; 0,0024 mmoles).

*Tr* (gradient A): 21.58 min; ESI-MS:  $4241.82 \pm 0,64$  [M] (calculé pour  $C_{180}H_{286}N_{56}O_{63}$ , [M] = 4242,59).

### Muc(Muc)PADRE (1)

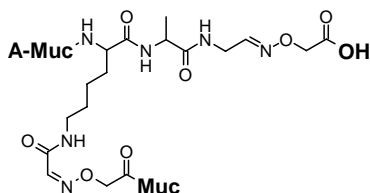


Muc(Muc)Acétal (**10**) en présence d'Aoa-PADRE (**2**) a été solubilisé dans 6 ml d'H<sub>2</sub>O puis placé dans un bain de glace. TFA (4 ml) a été ajouté et la solution a été agitée pendant 6 min. Après évaporation sous vide, le produit a été dissout dans un tampon acétate 0,1 M pH 4,6 (6 ml) et analysé immédiatement par HPLC. Le peptide (**1**) a été purifié par HPLC sur une colonne C4. Après lyophilisation, 5,6 mg de produit ont été obtenus sous forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 10%.

*Tr* (gradient B): double pic: 45,42/46,29 min; ESI-MS:  $5533,46 \pm 0,45$  [M] (calculé pour  $C_{242}H_{385}N_{73}O_{76}$ , [M] = 5533,16).

## II . 2 . Synthèse des autres chimères non glycosylées

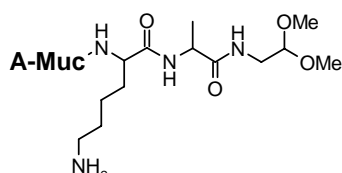
### Muc(Muc)oxOH (13)



Muc(Muc)acétal (**10**) (obtenu à partir de 0,019 mmoles de Muc(Ser)Acétal (**4**)) en présence de 1,4 mg d'Aoa a été solubilisé dans 6 ml d'H<sub>2</sub>O. puis placé dans un bain de glace. TFA (4 ml) a été ajouté et la solution a été agitée pendant 6 min. Après évaporation sous vide du TFA, le produit a été dissous dans un tampon acétate 0,1 M pH 4,6 (6 ml) et analysé immédiatement par HPLC. Le peptide (**13**) a été purifié par HPLC sur une colonne C18. Après lyophilisation, 20,3 mg de produit ont ainsi été obtenus sous forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 25%.

*Tr* (gradient B): 30,01 min; ESI-MS: 4267,67 ± 0,88 [M] (calculé pour C<sub>180</sub>H<sub>283</sub>N<sub>57</sub>O<sub>64</sub>, [M] = 4269,52).

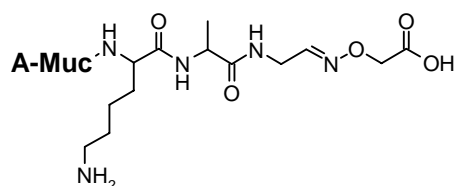
### MucAcétal (16)



MucAcétal (**16**) a été obtenu par aminolyse du peptide résine A-Muc-K-A-PAM-PEGA avec l'acétaldéhyde diméthylacétal selon la procédure décrite précédemment puis purifié par Sep-Pak®.

*Tr* (gradient A): 15,02 min; Maldi: 2241,91 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>96</sub>H<sub>158</sub>N<sub>30</sub>O<sub>32</sub>, [M] = 2243,17)

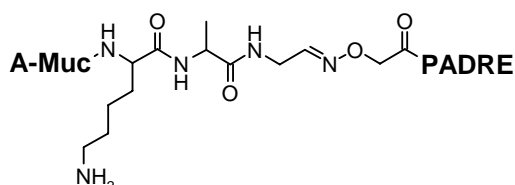
### MucoxOH (14)



MucoxOH (**14**) a été obtenu avec un rendement de 35% par traitement TFA de MucAcétal (**16**) en présence d'Aoa puis purifié par HPLC sur une colonne C18.

*Tr* (gradient A): 16,46 ; 16,64 min; ESI-MS: 2270,47 ± 0,15 [M] (calculé pour C<sub>96</sub>H<sub>155</sub>N<sub>31</sub>O<sub>33</sub>, [M] = 2271,48)

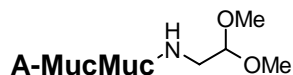
### MucoxPADRE (11)



MucoxPADRE (**11**) a été obtenu avec un rendement de 18% par traitement TFA de MucAcétal (**16**) en présence d'Aoa-PADRE (**2**) puis purifié par HPLC sur une colonne C4.

*Tr* (gradient A): 37,15 ; 37,94 min; ESI-MS: 3533,68 ± 0,13 [M] (calculé pour C<sub>158</sub>H<sub>257</sub>N<sub>47</sub>O<sub>45</sub>, [M] = 3535,07).

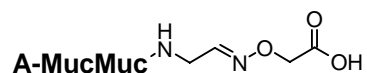
### MucMucAcétal (17)



MucMucAcétal (**17**) a été obtenu par aminolyse du peptide résine A-MucMuc-K-A-PAM-PEGA avec l'acétaldéhyde diméthylacétal selon la procédure décrite précédemment puis purifié par Sep-Pak®.

*Tr* (gradient D): 13,81 min; ESI-MS: 5204,75 ± 1,05 [M] (calculé pour C<sub>167</sub>H<sub>266</sub>N<sub>52</sub>O<sub>57</sub>, [M] = 3914,26)

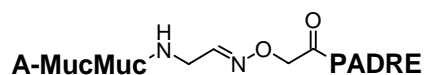
### MucMucOxOH (15)



MucMucOxOH (**15**) a été obtenu avec un rendement de 34% par traitement TFA de MucMucAcétal (**17**) en présence d'Aoa puis purifié par HPLC sur une colonne C18.

*Tr* (gradient C): 26,5 min; ESI-MS: 3942,24 ± 2,07 [M] (calculé pour C<sub>167</sub>H<sub>263</sub>N<sub>53</sub>O<sub>58</sub>, [M] = 3941,25)

### MucMucOxPADRE (12)



MucMucOxPADRE (**12**) a été obtenu avec un rendement de 22% par traitement TFA de MucMucAcétal (**17**) en présence d'Aoa-PADRE (**2**) puis purifié par HPLC sur une colonne C18.

*Tr* (gradient D): 19,48 ; 19,78 min; ESI-MS: 5204,75 ± 1,05 [M] (calculé pour C<sub>229</sub>H<sub>365</sub>N<sub>69</sub>O<sub>70</sub>, [M] = 5204,84)

## **II . 3 . Etude de l'immunogénicité**

### **II . 3 . A . Immunisation des souris**

Chacun des immunogènes (1mg) a été dissous dans 1,8 ml de PBS. Pour chaque immunisation, 600 µl de la solution ont été émulsionnés avec 600 µl d'adjuvant incomplet de Freund. 1/3 de l'émulsion a été injectée en sous-cutané à chaque souris préalablement anesthésiée par inhalation d'éther. L'opération a été répétée 15 puis 30 jours après.

15 jours après la dernière immunisation, le sang a été prélevé dans le sinus rétro-orbital de chaque souris puis centrifugé. Les sérums sont séparés des globules rouges puis congelés à -20°C.

### **II . 3 . B . Tests Elisa**

Muc8 (100 ng par puits) en solution dans le tampon carbonate 200 mM pH 9,6 (50µl) a été incubé dans chaque puits des plaques de microtitration pendant la nuit. Les plaques ont ensuite été rincées trois fois avec du PBS. Les sites non recouverts ont été saturés en ajoutant la gélatine 1% dans le PBS (150 µl par puits). Les plaques ont été mises à incuber 30 min à 37°C puis rincées trois fois avec du PBS contenant 0,25% de tween 20.

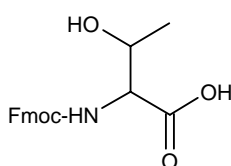
Les solutions de sérum dilués dans le PBS (50 µl) ont été déposées dans trois puits chacune. Les plaques recouvertes d'un film plastique ont été mises à incuber 1h à 37°C avant d'être rincées trois fois avec du PBS contenant 0,25% de tween 20. La solution d'anticorps de chèvre couplés à la peroxydase (1/3000 dans PBS contenant 0,1% de BSA ; 50 µl par puits) a alors été incubée 1h à 37°C. Après trois rinçages avec du PBS contenant 0,25% de tween et deux rinçages avec du PBS, l'ABTS (0,2 mg/ml, tampon phosphate pH 5, 100 µl par puits) a été ajouté. Après 20 min à température ambiante, la réaction a été bloquée avec l'acide oxalique à 0,2 % dans H<sub>2</sub>O (50 µl par puits). L'absorbance de chaque puits a été mesurée à 405 nm et a permis de tracer les courbes de titration.

### III . Synthèse des chimères glycosylées

Les modes opératoires des molécules décrites dans la partie III des « Résultats et Discussion » sont décrits dans cette partie ainsi que les essais d'immunisation réalisés avec ces molécules.

#### III . 1 . Synthèse des synthons Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20) Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (21)

Fmoc-Thr-OH (25') CAS number : 73731-37-0

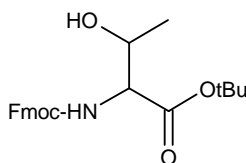


Fmoc-OSu (50,00 g ; 148 mmoles) a été additionné, sous agitation, à une solution de thréonine (17,82 g ; 148 mmoles) et de NaHCO<sub>3</sub> (12,48 g ; 148 mmoles) dans un mélange acétone/H<sub>2</sub>O, 1:1 (800 ml). L'émulsion a été agitée pendant la nuit. La solution limpide obtenue a été acidifiée avec HCl concentré (pH 2). Le produit a été extrait avec 800 ml de DCM. Les phases organiques ont été lavées avec HCl 1N (2 x 400 ml) et H<sub>2</sub>O (2 x 400 ml) puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant a ensuite été éliminé sous vide.

52,14 g (rendement quantitatif) ; huile jaune ; R<sub>f</sub> = 0,85 (AcOEt/AcOH ; 10/1) ; FD : 341,5 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>, [M] = 341,13).

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] : 7,69 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,35 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,54 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 6,99 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,40-7,22 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc) ; 5,75 (d, 1H, J<sub>NH,T $\alpha$</sub>  = 8,46, NH-Uréthane) ; 4,44-4,31 (m, 4H, CH2-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> , T <sup>$\beta$</sup> ) ; 4,13 (t, 1H, J<sub>H9,CH2</sub> = 6,82 Hz, H9-Fmoc) ; 1,31 (d, 3H, J<sub>T $\beta$ ,T $\gamma$</sub>  = 6,34Hz, T <sup>$\gamma$</sup> )

#### Fmoc-Thr-OtBu (25)



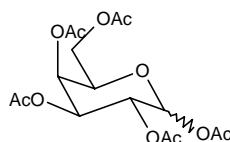
Une solution de DCC (48,26 g ; 234 mmoles), de *t*BuOH (22,57 g ; 282 mmoles) et de CuCl (0,6 g ; 6 mmoles) a été agitée sous argon à l'abri de la lumière pendant 4 jours puis diluée avec 100 ml de DCM fraîchement distillé. Une solution de Fmoc-Thr-OH (**25'**) (24 g ; 70 mmoles) dans 100 ml de DCM fraîchement distillé a alors été ajoutée goutte à goutte pendant 40 min. Le mélange a été agité pendant 1h puis filtré sur Büchner. La solution a été lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> jusqu'à ce que la phase aqueuse devienne incolore (10 x 100 ml) puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant a ensuite été éliminé sous vide.

Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 4/1).

18,19 g (63%) ; solide moussieux blanc ; R<sub>f</sub> = 0,55 (Toluène/Acétone ; 4/1)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] : 7,75 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,35 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,60 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 6,96 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,38-7,22 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc) ; 5,58 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 8,30, NH-Uréthane) ; 4,40 (d, 2H, J<sub>CH2,H9-Fmoc</sub> = 7,32Hz, CH2-Fmoc) ; 4,30-4,17 (m, 3H, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>) ; 1,47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,23 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 5,86 Hz, T<sup>γ</sup>)

### α,β-Ac<sub>5</sub>Gal (30)

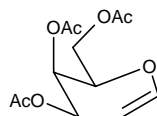


Une solution de 150 ml d'anhydride acétique et de 150 ml de pyridine a été refroidie dans un bain de glace. Le D-Galactose (60 g ; 166 mmoles) a ensuite été additionné lentement en maintenant la température en dessous de 5°C. La suspension jaune a été maintenue sous agitation, pendant 1h à 0°C puis une nuit à température ambiante. La solution limpide orangée a été refroidie dans la glace. 300 ml d'H<sub>2</sub>O ont alors été précautionneusement ajoutés. Le produit a été extrait avec CHCl<sub>3</sub> (4 x 100 ml). Les phases organiques ont été lavées avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant a ensuite été éliminé sous vide. Le résidu a été codistillé deux fois avec du toluène.

65,8 g (quantitatif) ; huile jaune ; R<sub>f</sub> = 0,50 ; 0,59 (α, β) (DCM/AcOH ; 5,5/1) ; FD : 347,5 [M-AcO<sup>-</sup>] (calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, [M] = 390,12)



**Ac<sub>3</sub>Galactal (32)** CAS number : 4098-06-0



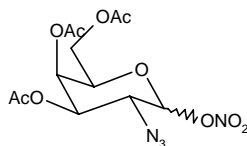
Une solution d' $\alpha,\beta$ -Ac<sub>5</sub>Gal (**30**) (65,8 mg ; 166 mmoles) dans 200 ml de CHCl<sub>3</sub> a été refroidie dans un bain de glace. 65 ml d'AcBr et 11 ml d'H<sub>2</sub>O ont alors été successivement ajoutés. La solution a été agitée 1h à 20°C puis évaporée et codistillée deux fois avec du toluène.

Le résidu  $\alpha$ -Ac<sub>4</sub>GalBr (**31**) a ensuite été repris dans 500 ml d'acide acétique et refroidi à 0 °C. 500ml d'H<sub>2</sub>O, 62 g de Zn et 6,25 g de CuSO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>5</sub> ont alors été ajoutés. La solution a été agitée dans la glace pendant la nuit puis filtrée sur un fritté. Le produit a ensuite été extrait avec du toluène (5 x 200 ml). Les phases organiques ont été lavées avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> (5 %, 3 x 200 ml) et H<sub>2</sub>O (200 ml) puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Le solvant a ensuite été éliminé sous vide.

35,04 g (77%) ; sirop rosé ; R<sub>f</sub> = 0,58 (DCM/AcOH ; 5,5/1)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] : 6,41 (dd, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 6,3,Hz, J<sub>H1,H3</sub> = 1,6 Hz, H1) ; 5,51 (m, 1H, H3) ; 5,38 (m, 1H, H4) ; 4,68 (ddd, 1H, J<sub>H2,H1</sub> = 6,3 Hz, J<sub>H2,H3</sub> = 2,5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H2,H4</sub> = 1,6 Hz, H2) ; 4,28 (t, 1H, J<sub>H5,H6</sub> = 5,6Hz, H5) ; 4,19 (m, 2H, H6) ; 2,08, 2,04, 1,98 (3s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>CO)

**$\alpha,\beta$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-ONO<sub>2</sub> (33)**



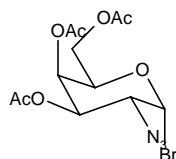
(NH<sub>4</sub>)Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (157,10g ; 287 mmoles ; séché sous vide pendant 4 jours) et NaN<sub>3</sub> (9,31g ; 143,25 mmoles ; séché sous vide pendant 1 jour) ont été ajoutés à une solution de Ac<sub>3</sub>Galactal (**32**) (26 g ; 95,5 mmoles) dans 450 ml de CH<sub>3</sub>CN fraîchement distillé placée à -20°C sous Argon. Le mélange a été vivement agité pendant 15h à -20°C, dilué avec 500 ml d'ether diéthylique, puis transféré dans un ballon contenant 500 ml de mélange H<sub>2</sub>O/Glace. La

phase organique a été séparée puis lavée avec H<sub>2</sub>O (3 x 300 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée.

Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 4/1).

13,18 g (37%) ; huile/cristaux incolore ( $\alpha/\beta$ ) ; R<sub>f</sub> = 0,51 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 2/1) ; FD : 330,5 [M-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] (calculé pour C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, [M] = 376,09)

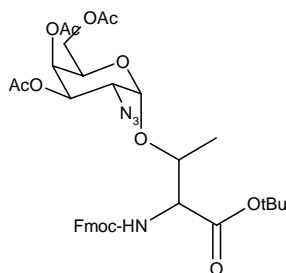
### $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (26)



Une suspension de bromure de lithium (10,97 g ; 126 mmoles ; séché sous vide pendant 1h ) dans 150 ml d'acétonitrile a été vigoureusement agitée pendant 1h sous argon, avant d'ajouter la solution de  $\alpha,\beta$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-ONO<sub>2</sub> (**33**) (6,57 g ; 17 mmoles ) dans 50 ml de CH<sub>3</sub>CN fraîchement distillée. Le mélange a ensuite été agité pendant 15h sous argon puis dilué avec 300 ml, lavée avec une solution saturée de NaCl (2 x 200 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporé. Le produit obtenu a été immédiatement utilisé pour la glycosylation.

6,11 g (88%) ; huile jaune.

### Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu (34)



Une solution de Fmoc-Thr-OtBu (**25**) (5,09 g ; 12 mmoles) dans 35 ml de toluène et 42 ml de DCM fraîchement distillé a été agitée pendant 1h sous argon à l'abri de la lumière avec 14,67 g de tamis moléculaire 4Å. La solution a ensuite été refroidie à 0°C puis Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,19 g ; 15 mmoles) et AgClO<sub>4</sub> (0,53 g ; 2,5 mmoles ; solution dans 18 ml de toluène fraîchement

distillé) ont successivement été additionnés. Le mélange a été agité pendant 30 min à 0°C sous argon à l'abri de la lumière.

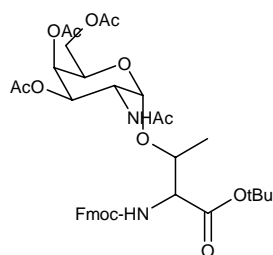
Une solution de  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br (**26**) (6,11 g ; 15,5 mmoles) dans 90 ml de toluène et 90 ml de DCM fraîchement distillé a été ajouté goutte à goutte à la solution pendant 30 min à 0°C. Après retour à température ambiante, le mélange a été agité sous argon à l'abri de la lumière pendant la nuit puis dilué avec 150 ml de DCM et filtré sur célite. Le filtrat a été lavé avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 200 ml) puis une solution saturée de NaCl (2 x 150 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée.

Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 5/1 à 3/1).

3,63 g (dont 3,16 g de produit attendu ; 37%) ; solide amorphe incolore ; R<sub>f</sub> = 0,48 (toluène/AcOEt ; 2/1) ; FD : 711,4 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>, [M] = 710,28)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] : 7,75 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,46 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,59 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7,32 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,42-7,27 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc) ; 5,64 (d, 1H, J<sub>NH,T $\alpha$</sub>  = 9,54 Hz, NH-Uréthane) ; 5,45 (d, 1H, J<sub>H3,H4</sub> = 2,92 Hz, H4-Gal) ; 5,32 (dd, 1H, J<sub>H2,H3</sub> = 11,04 Hz, J<sub>H3,H4</sub> = 2,92 Hz, H3-Gal) ; 5,09 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3,66 Hz, H1-Gal) ; 4,44-4,14 (m, 6H, H9-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> , T <sup>$\beta$</sup> , H5-, H6-Gal) ; 4,08 (d, 2H, J<sub>CH<sub>2</sub>,H<sub>9</sub>-Fmoc</sub> = 6,27 Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 3,62 (dd, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3,90 Hz, J<sub>H2,H3</sub> = 11,04 Hz, H2-Gal) ; 2,13, 2,06, 2,03 (3\*s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>CO) ; 1,48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,33 (d, 3H, J<sub>T $\beta$ ,T $\gamma$</sub>  = 6,34 Hz, T <sup>$\gamma$</sup> )

### Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**)



Zn (3,86 g ; 59 mmoles) a été activé dans une solution aqueuse de CuSO<sub>4</sub> (2%, 200 ml) pendant 15 min puis filtré sur un fritté, lavé à l'eau et séché avec de l'éther diéthylique. Il a ensuite été ajouté à une solution de Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu (**34**) (3,63 g ; 5 mmoles) dans 210 ml d'un mélange THF/Ac<sub>2</sub>O/AcOEt, 3:2:1. Le mélange a été agité pendant 2h puis dilué avec 300 ml de THF et filtré sur célite. Le filtrat a été évaporé et codistillé avec du toluène (4 x). Le résidu a été repris avec 100 ml de DCM. La solution a ensuite été lavée avec

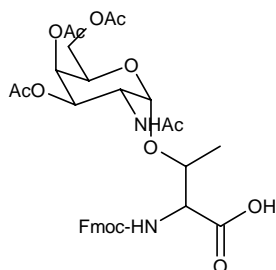
une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 150 ml) et une solution saturée de NaCl (2 x 100 ml) puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée.

Le produit a été purifié par Chromatographie éclairée sur colonne de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 1/2).

2,12 g (57%) ; solide mousseux incolore ; R<sub>f</sub> = 0,25 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 2/1) ; FD : 727,5 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>, [M] = 726,30)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] : 7,76 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,46 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,62 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7,32 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,44-7,26 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc) ; 5,97 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 9,76 Hz, NH-CH<sub>3</sub>) ; 5,54 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 9,26 Hz, NH-Uréthane) ; 5,38 (d, 1H, J<sub>H3,H4</sub> = 2,92 Hz, H4-Gal) ; 5,07 (dd, 1H, J<sub>H2,H3</sub> = 11,04 Hz, J<sub>H3,H4</sub> = 2,92 Hz, H3-Gal) ; 4,96 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3,42 Hz, H1-Gal) ; 4,66-4,53 (m, 1H, H2-Gal) ; 4,48-4,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 4,30-4,03 (m, 6H, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H5-, H6-Gal) ; 2,14, 2,02, 1,98 (3s, 12H, 3 x CH<sub>3</sub>CO + NHCOCH<sub>3</sub>) ; 1,45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,31 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 6,34 Hz, T<sup>γ</sup>)

**Fmoc-Thr(α-Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (20)** CAS number : 116783-35-8



Fmoc-Thr(α-Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**) (240 mg ; 0,33 mmoles) a été dissous dans 7,6 ml de TFA et 0,6 ml d'anisole. La solution a ensuite été agitée pendant 1h30 puis évaporée et le résidu a été codistillé 5 fois avec du toluène.

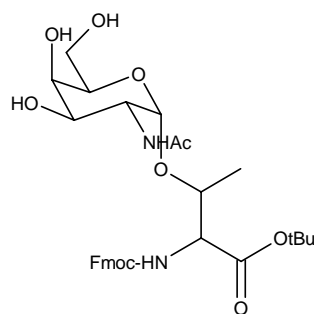
Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (AcOEt /AcOH ; 100/3).

225,7 mg (rendement quantitatif) ; solide amorphe blanc ; R<sub>f</sub> = 0,22(AcOEt /AcOH ; 100/3) ; Tr (gradient E): 14,66 min ; FD : 671,3 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>, [M] = 670,24)

500 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO), δ [ppm] : 7.91 (d, 2H, J<sub>H4-Fmoc-H3-Fmoc</sub> = J<sub>H5-Fmoc-H6-Fmoc</sub> = 7.55Hz, H4, H5-Fmoc) ; 7,73 (dd, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.38 Hz, J<sub>H1,H3</sub> = J<sub>H8,H6</sub> = 3.46,Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7.42 (t, 2H, J<sub>H2,H3</sub> = J<sub>H3,H4</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = J<sub>H6,H7</sub> = 7,47 Hz, H3-, H6-Fmoc) ; 7.33 (t,

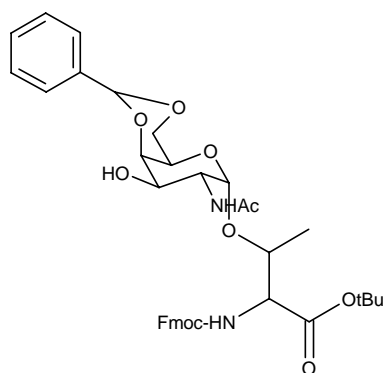
2H,  $J_{H1,H2} = J_{H2,H3} = J_{H6,H7} = J_{H7,H8} = 7,41$  Hz, H2-, H7-Fmoc) ; 5,30 (d, 1H,  $J_{H3,H4} = 2,76$  Hz, H4-Gal) ; 5,03 (dd, 1H,  $J_{H2,H3} = 11,56$  Hz,  $J_{H3,H4} = 3,14$  Hz, H3-Gal) ; 4,8 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 3,61$  Hz, H1-Gal) ; 4,47-4,01 (m, 9H, H2-Gal, CH<sub>2</sub>-Fmoc, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H5-, H6-Gal) ; 2,10, 1,99, 1,90, 1,84 (s, 12H, 3 x CH<sub>3</sub>CO + NHCOCH<sub>3</sub>) ; 1,16 (d, 3H,  $J_{T\beta,T\gamma} = 6,37$  Hz, T<sup>γ</sup>)

### **Fmoc-Thr(α-GalNAc)-OtBu (35)**



Fmoc-Thr(α-Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**24**) (1,08 g ; 1,49 mmoles) a été mis en solution dans 35 ml de méthanol absolu. Le pH a été précautionneusement ajusté à 8,5 avec une solution de MeONa/MeOH 1%. La solution a été agitée pendant 7h, le pH ayant été régulièrement contrôlé et ajusté, puis neutralisée avec de l'amberlite IR 120, filtrée et évaporée. Le produit obtenu a directement été utilisé pour la réaction suivante.

### **Fmoc-Thr(α-4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (27)**



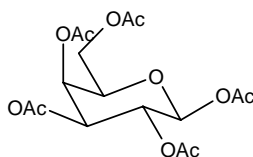
Fmoc-Thr(α-GalNAc)-OtBu (**35**) a été dissout dans 170 ml de CH<sub>3</sub>CN fraîchement distillée. 450 µl de benzaldéhyde diméthylacétal ont été ajoutés. Le pH a été ajusté à 4 avec de l'acide para-toluènesulfonique. La solution a été agitée pendant 19h puis neutralisée et évaporée.

Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 2/3).

507,4 mg (50% sur les 2 étapes); solide moussieux blanc; R<sub>f</sub> = 0,46 (Toluène/Ethanol ; 4/1); FD : 689,7 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>, [M] = 688,30)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] : 7,76 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,46 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,62 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7,32 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,53-7,48 (m, 2H, H<sub>méta</sub>-Bzn) ; 7,42-7,26 (m, 7H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H<sub>ortho</sub>-, H<sub>para</sub>-Bzn) ; 6,47 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 8,46 Hz, NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 5,56 (s, 1H, CH-Bzn) ; 5,42 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 9,54 Hz, NH-Uréthane) ; 4,93 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3,3 Hz, H1-Gal) ; 4,50-4,44 (m, 3H, H2-Gal, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 4,26-4,02 (m, 6H, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H5-, H6-Gal) ; 3,84-3,81 (m, 1H, H3) ; 3,70 (s, 1H, H4-Gal) ; 2,07, (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>) ; 1,45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,31 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 6,34 Hz, T<sup>γ</sup>)

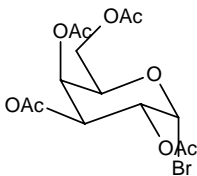
### **β-Ac<sub>5</sub>Gal (36)** CAS number : 4163-60-4



Une solution de 5,8 g de CH<sub>3</sub>COONa anhydre dans 40 ml d'anhydride acétique a été portée à ébullition. L' $\alpha,\beta$ -D-Galactose (7,2 g ; 40 mmoles) a alors été ajouté par fraction. Le reflux a été maintenu pendant 20 min. La solution encore chaude a été versée dans un mélange acétone/H<sub>2</sub>O, glace, 20:280. Le mélange a ensuite été agité pendant la nuit. Le précipité blanc-cassé formé a été isolé par filtration puis recristallisé dans le méthanol.

5,04 g (33%) ; cristaux blancs ; R<sub>f</sub> = 0,60 (DCM/AcOEt ; 5,5/1) ; Pf : 139°C ; FD : 347,5 [M-AcO<sup>-</sup>] (calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, [M] = 390,12)

### **α-Ac<sub>4</sub>Gal-Br (28)**

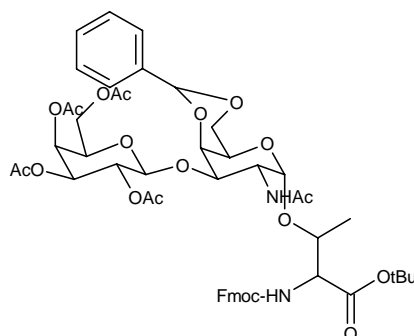


β-Ac<sub>5</sub>Gal (36) (3,10 g ; 7,9 mmoles) a été dissout dans 18 ml d'une solution HBr/AcOH 33%. La solution a ensuite été agitée pendant 2h, évaporée et codistillée deux fois

avec du toluène. Le résidu a été repris dans 30 ml d'éther puis filtré. Le filtrat a été recristallisé par ajout de pentane.

2,57 g (79%) ; cristaux blancs ;  $R_f = 0,84$  (DCM/AcOEt ; 5,5/1) ; Pf : 83°C ; FD : 331,6 [M-Br<sup>-</sup>] (calculé pour C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>9</sub>, [M] = 410,02)

### III. 1. A. a. Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu (29)



Une solution de Fmoc-Thr(α-4,6-O-Bzn-GalNAc)-OtBu (**27**) (425 mg ; 0,62 mmoles) dans 15 ml d'un mélange DCM/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, 3:5 a été agitée pendant 45 min avec 1,5 g de tamis moléculaire 4Å et une première fraction d'Hg(CN)<sub>2</sub> (326 mg ; 1,44 mmoles). Après avoir refroidi le mélange dans la glace, une solution de α-Ac<sub>4</sub>Gal-Br (**28**) (800 mg ; 1,94 mmoles) dans 5 ml du mélange DCM/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, 3:5 a été ajoutée goutte à goutte. Une deuxième fraction Hg(CN)<sub>2</sub> (400 mg ; 1,76) a alors été introduite. Le mélange a été agité pendant 16h puis dissout avec 50 ml de DCM et filtré sur célite avec 50 ml d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>. La phase organique a été séparée, lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 ml) et une solution saturée de NaI (2 x 50 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée.

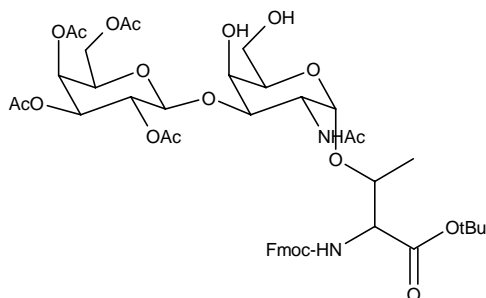
Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 1/1 puis 1/2).

461,9 mg (73%) ; solide mousseux blanc ;  $R_f = 0,45$  (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 1/3) ; FD : 1021,6 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>52</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>, [M] = 1018,39)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] : 7,79 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7,46$  Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,65-7,58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc) ; 7,53-7,48 (m, 2H, H<sub>mé</sub>ta-Bzn) ; 7,42-7,29 (m, 7H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H<sub>ortho</sub>-, H<sub>para</sub>-Bzn) ; 5,83 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 9,54$  Hz, NHOCH<sub>3</sub>) ; 5,54 (s, 1H, CH-Bzn) ; 5,57 (d, 1H,  $J_{H3',H4'} = 2,58$  Hz, H4'-Gal) ; 5,17 (dd, 1H,  $J_{H1',H2'} = 7,74$  Hz,  $J_{H2',H3'} = 10,29$  Hz H2'-Gal) ; 4,99-4,90 (m, 2H, H1-, H3'-Gal) ; 4,74-4,62 (m, 2H, H2-, H1'-Gal) ; 4,54-4,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 4,28-4,16 (m, 6H, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H4, H6a-, H6a'-Gal) ; 4,12-4,03 (m, 2H, H6b-, H6'-Gal) ; 3,92-3,81 (m, 2H, H3-, H5'-Gal) ; 3,68-3,64 (m,

1H, H5-Gal) ; 2,13 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>) ; 2,03, 2,02, 1,99, 1,95 (4s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>CO) ; (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,26 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 6,34 Hz, T<sup>γ</sup>)

**Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-GalNAc)-OtBu (37)**



Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu (**29**) (449,9 mg ; 441,5 mmoles) a été dissout dans 30 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique (80%). La solution a été agitée pendant 1h à 80°C puis 30 ml de toluène ont été ajoutés . Le mélange a ensuite été évaporé et codistillé deux fois avec du toluène.

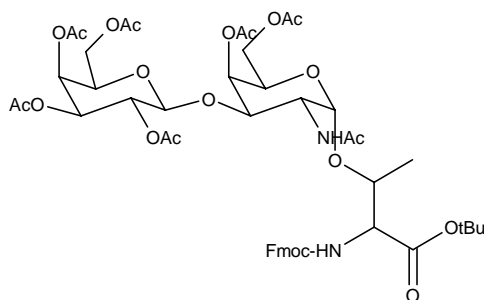
Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (AcOEt).

331,9 mg (81%) ; solide mousseux blanc ; R<sub>f</sub> = 0,43 (AcOEt/Ethanol ; 15/1) ; FD : 933,3 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>45</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>, [M] = 930,36)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] : 7,77 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,35 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,59 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 6,24 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,45-7,28 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc) ; 5,90 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 9,57 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>) ; 5,44 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 8,82 Hz, NH-Uréthane) ; 5,36 (d, 1H, J<sub>H3',H4'</sub> = 2,94 Hz, H4'-Gal) ; 5,18 (dd, 1H, J<sub>H1',H2'</sub> = 7,74 Hz, J<sub>H2',H3'</sub> = 10,65 Hz H2'-Gal) ; 4,97-4,93 (dd, 1H, H3'-Gal) ; 4,83-4,78 (m, 1H, H1-Gal) ; 4,62-4,45 (m, 4H, H2-, H1'-Gal, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 4,35-3,97 (m, 8H, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H4, H6-, H6'-Gal) ; 3,96-3,73 (m, 2H, H5-, H5'-Gal) ; 3,72-3,62 (dd, 1H, H3-Gal) ; 2,14 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>) ; 2,06, 2,02, 1,98, 1,96 (4s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>CO) ; 1,43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,23 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 6,34 Hz, T<sup>γ</sup>)



### Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OtBu (38)



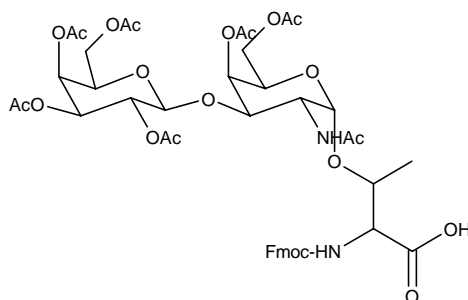
Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-GalNAc)-OtBu (**37**) (305,5 mg ; 0,3281 mmoles) a été dissout dans 20 ml d'un mélange pyridine/anhydride acétique, 3:1. La solution a été agitée pendant 19h. 40 ml de glace ont ensuite été ajoutés. Le produit a ensuite été extrait avec du DCM (3 x 20ml). La phase organique a été lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40ml) et une solution saturée de NaCl (2 x 40 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée.

Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (AcOEt).

271,8 mg (82%) ; solide mousseux blanc ; R<sub>f</sub> = 0,45 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt ; 1/3) ; FD : 1016,6 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>49</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>21</sub>, [M] = 1014,38)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] : 7,78 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7,35 Hz, H4-, H5-Fmoc) ; 7,60 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 6,24 Hz, H1-, H8-Fmoc) ; 7,42-7,46 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc) ; 5,89 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 9,57 Hz, NH-CH<sub>3</sub>) ; 5,46 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 9,21 Hz, NH-Uréthane) ; 5,33 (d, 1H, J<sub>H3',H4'</sub> = 2,58 Hz, H4'-Gal) ; 5,06 (dd, 1H, J<sub>H1',H2'</sub> = 8,07 Hz, J<sub>H2',H3'</sub> = 10,65 Hz H2'-Gal) ; 4,91 (dd, 1H, J<sub>H2',H3'</sub> = 10,29 Hz, J<sub>H3',H4'</sub> = 2,94 Hz, H3'-Gal) ; 4,83-4,77 (m, 1H, H1-Gal) ; 4,62-4,45 (m, 4H, H2-, H1'-Gal, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 4,26-3,93 (m, 8H, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H4, H6-, H6'-Gal) ; 3,71-3,90 (m, 3H, H3-, H5-, H5'-Gal) ; 2,14, 2,11, 2,04, 2,03, 2,02, 1,99, 1,94 (7s, 21H, 6 x CH<sub>3</sub>CO + NHCH<sub>3</sub>CO) ; 1,43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 1,23 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 6,34 Hz, T<sup>γ</sup>)

### Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (21)



Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal(β1→3)-α-Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OtBu (**38**) (261,3 mg ; 0,27 mmoles) a été dissous dans 13,6 ml de TFA et 1,3 ml d'anisole. La solution a été agitée pendant 2h puis évaporée. Le résidu a été codistillé 3 fois avec du toluène.

Le produit a été purifié par chromatographie éclairée sur colonne de silice (AcOEt /Ethanol ; 30/1).

221,7 g (90%) ; solide amorphe blanc ;  $R_f = 0,3$ (AcOEt /Ethanol; 30/1) ;  $Tr$  (gradient E): 17,68 min ; ESI : 981,07 [M] (calculé pour C<sub>45</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>21</sub>, [M] = 958,92 )

500 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO),  $\delta$  [ppm] : 7.90 (d, 2H,  $J_{H4-Fmoc-H3-Fmoc} = J_{H5-Fmoc-H6-Fmoc} = 7,54$  Hz, H4, H5-Fmoc) ; 7,73 (m, 2H, Hz, H1-,H8-Fmoc) ; 7.42 (t, 2H,  $J_{H2,H3} = J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = J_{H6,H7} = 7,44$  Hz, H3-, H6-Fmoc) ; 7.33 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc) ; 5,30 (d, 1H,  $J_{H3,H4} = 2,9$  Hz, H4-Gal) ; 5,23 (d, 1H,  $J_{H3',H4'} = 3,45$  Hz, H4'-Gal) ; 5,05 (dd, 1H,  $J_{H2',H3'} = 10,37$  Hz,  $J_{H3',H4'} = 3,55$  Hz, H3'-Gal) ; 4.85 (m, 1H, H2'-Gal) ; 4.77 (d, 1H,  $J_{H1',H2'} = 8$  Hz, H1'-Gal) ; 4.70 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 3,59$  Hz, H1-Gal) ; 4,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc) ; 4,28 (m, 1H, CH-Fmoc) ; 4,19-3,80 (m, 8H, H2-, H3-, H5-, H5', H6, H6'-Gal, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>) ; 2,10 ; 2,04 ; 2,03 ; 1,99 ; 1,98 ; 1,90 ; 1,84 (s, 21H, 6 x CH<sub>3</sub>CO + NHCOCH<sub>3</sub>) ; 1,11 (d, 3H,  $J_{T\beta,T\gamma} = 6,14$  Hz, T<sup>γ</sup>)

### III . 2 . Synthèses des glycopeptides Aoa-Muc (18) et Aoa-Muc T (19)

#### Glycopeptides acétylés (22) et (23)

**22** : H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDT( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)RPAPGSTA-OH

**23** : H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDT(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\beta$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)RPAPGSTA-OH

L'élongation du peptide RPAPGSTA C-terminal été réalisée avec le synthétiseur de peptide sur une résine Fmoc-Ala-Wang (147 mg ; 0,68 mmoles) avec un rendement quantitatif. Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**20**) (36,89 mg ; 0,055 mmoles) et Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**) (34,81 mg ; 0,036 mmoles) ont été couplés sur respectivement 0,050 et 0,033 mmoles de peptide-résine avec 1,1 équivalents d'HATU et 1,3 équivalents de DIEA selon la procédure générale de couplage manuel (3h). Le Fmoc a été éliminé par un traitement pipéridine/NMP, 2:8 (3 ml), 3 x 5 min, et l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine a été dosé par spectroscopie UV donnant un rendement de couplage de 92 % pour Fmoc-Thr( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**20**) et 90 % pour Fmoc-Thr(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH (**21**). La suite de l'élongation de la séquence Muc a été effectuée pour les deux lots sur le synthétiseur de peptide avec des rendements de 83 et 100 %.

Les peptide-résines ont ensuite été introduits dans des seringues équipées d'un fritté et le résidu Boc-Aoa-OH a été couplé manuellement selon la procédure générale avec HATU comme agent de couplage. 164 et 151 mg de peptide-résine Boc-Aoa-Muc( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Wang et Boc-Aoa-Muc(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc)-Wang ont ainsi été obtenus.

41 mg (0,0091 mmoles) et 36 mg (0,0073 mmoles) des peptides-résines ont été introduits dans des seringues équipées d'un fritté, lavés avec du DCM (3x) et traités avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 95:2,5:2,5 (1 ml). Les peptides ont ensuite été précipités et lavés avec de l'éther. 16,1 mg d'Aoa-Muc( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc) (**22**) (soit un rendement de 77%) et 15,1 mg d'Aoa-Muc(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc) (**23**) (soit un rendement de 80%) ont ainsi été obtenus.

Aoa-Muc( $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>GalNAc) (**22**) : *Tr* (gradient A): 21,68 min; Maldi: 2288,52 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>96</sub>H<sub>149</sub>N<sub>27</sub>O<sub>38</sub>, [M] = 2288,06)

Aoa-Muc(Ac<sub>4</sub>Gal( $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>3</sub>)- $\alpha$ -Ac<sub>2</sub>GalNAc) (**23**) : *Tr* (gradient A): 28,09 min; Maldi: 2575,802 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>108</sub>H<sub>165</sub>N<sub>27</sub>O<sub>46</sub>, [M] = 2576,14)

## Aoa-MucTn (18) et Aoa-MucT (19)

**18** : H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDT(GalNAc)RPAPGSTA-OH

**19** : H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDT(Gal(β<sub>1</sub>→<sub>3</sub>)GalNAc)RPAPGSTA-OH

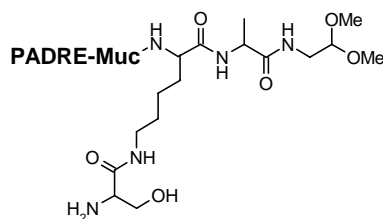
Les glycopeptides Aoa-Muc(α-Ac<sub>3</sub>GalNAc) (**22**) Aoa-Muc(Ac<sub>4</sub>Gal(β<sub>1</sub>→<sub>3</sub>)-α-Ac<sub>2</sub>GalNAc) (**23**) ont été solubilisés dans du méthanol anhydre (2mg/ml) et une solution de MeONa 1% dans le méthanol a été ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH 8,5 pour Aoa-Muc(α-Ac<sub>3</sub>GalNAc) (**22**) et 9 pour Aoa-Muc(Ac<sub>4</sub>Gal(β<sub>1</sub>→<sub>3</sub>)-α-Ac<sub>2</sub>GalNAc) (**23**). Les solutions ont été agitées pendant respectivement 2 et 5h. Les milieux ont ensuite été neutralisés par l'ajout d'acide acétique et évaporés. Les peptides ont alors été solubilisés dans l'eau (1 à 2 mg/ml) et engagés directement dans les réactions de ligation.

Aoa-MucTn (**18**) : *Tr* (gradient A): 10,84 min; Maldi : 2163,03 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>90</sub>H<sub>143</sub>N<sub>27</sub>O<sub>35</sub>, [M] = 2162,02)

Aoa-MucT (**19**) : *Tr* (gradient A): 10,16 min; Maldi : 2325,01 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>96</sub>H<sub>153</sub>N<sub>27</sub>O<sub>40</sub>, [M] = 2324,08)

### III . 3 . Synthèse du synthon PADRE-Muc(CHO)Acétal (46)

#### PADRE-Muc(Ser)Acétal (40)



**PADRE-Muc** = aKXVAAWTLKaAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTA  
(a: D-Ala; X: cyclohexylalanine)

L'élargissement du peptide PADRE-Muc-K(S)-A-PAM-PEGA a été réalisé à partir d'une résine A-PAM-PEGA (6) en suivant le même mode opératoire que pour le peptide-résine Muc(Ser)-PAM-PEGA (5).

L'adduit fluorénylméthyl-piperidine formé lors de l'élimination du Fmoc du premier acide aminé a été dosé par spectroscopie UV ( $\lambda = 301 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) pour donner la quantité initiale d'amines disponibles (0,073 mmoles). Le dipeptide Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\Psi^{\text{Me, Me}}$  Pro)-OH a été introduit lors de l'élargissement à la place des deux résidus W<sup>7</sup>T<sup>8</sup>. L'acide aminé N-terminal a été introduit sous la forme Boc-D-Ala-OH. Le rendement d'élargissement est quantitatif. La résine a ensuite été divisée en quatre fractions identiques.

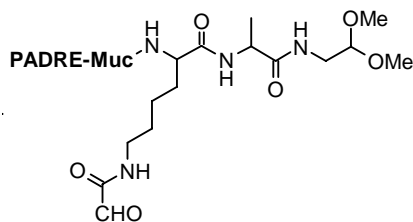
Après déprotection du  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine d'un des lots (0,183 mmoles) par un traitement TFA/DCM/TIS, 1:98:2 (~30 x 2 min, 3 ml), Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (47,9 mg, 0,125 mmoles) a été couplé manuellement selon la procédure générale. L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine libéré lors de la déprotection du Fmoc par le traitement pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) donnant 0,0185 mmoles. Le rendement total (élargissement et couplage de la sérine) est donc quantitatif. Le peptide a ensuite été déprotégé par un traitement TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2.5:2.5 (3 ml) pendant 2 h.

Le peptide-résine PADRE-Muc-K(S)-A-PAM-PEGA a été lavé avec du DMF (3x). 2,8 ml d'acétaldéhyde-diméthylacétal et 1,4 ml de DMF ont alors été ajoutés au peptide-résine. Le milieu a été maintenu à 40°C pendant 18h sous agitation lente puis filtré. La résine a été rincée avec du DMF (3 x) et le peptide a été extrait avec TFE (3 x 5 min) et HFIP (3 x 5 min). L'ensemble des filtrats a été rassemblé et évaporé sous vide. Le résidu a ensuite été solubilisé dans 12 ml d'eau acidifiée avec de l'acide acétique à pH 5. 1,2 ml de pipéridine ont alors été ajoutés. La solution a été agitée pendant 3h puis évaporée sous vide. Le produit

PADRE-Muc(Ser)Acétal (**40**) ainsi obtenu a été solubilisé dans 12 ml d'eau puis analysé par HPLC.

*Tr* (gradient A): 33,94 min; Maldi : 3522,75 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>158</sub>H<sub>259</sub>N<sub>45</sub>O<sub>46</sub>, [M] = 3522,93).

### PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**)

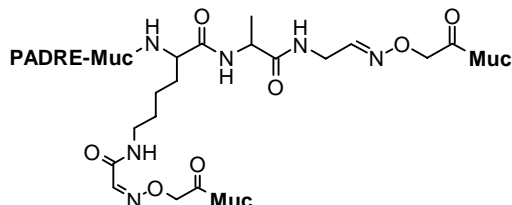


NaIO<sub>4</sub> (7,91 mg ; 0,037 mmoles) a été ajouté à la solution de PADRE-Muc(Ser)Acétal (**40**). Après 15 minutes d'agitation, l'éthane-diol (4,1 µl, 0,074 mmoles) a été additionné pour stopper la réaction. La moitié de la solution a ensuite été purifiée par HPLC sur une colonne C4 et lyophilisée. 12,3 mg de produit (soit un rendement global déterminé à partir du taux de substitution de la résine de 38 %) ont été obtenus sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 33,67 min; Maldi : 3492,33 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>157</sub>H<sub>254</sub>N<sub>44</sub>O<sub>46</sub>, [M] = 3491,89).

### III . 4 . Ligations

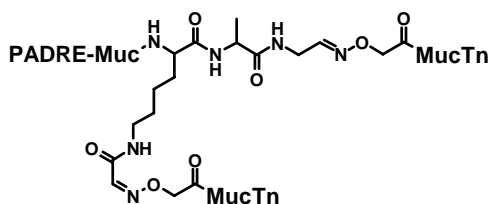
#### PADRE-Muc(Muc)Muc (45)



A une solution de PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) (7,5 mg ; 0,00215 mmoles) dans 7,5 ml d'H<sub>2</sub>O placée dans un ballon a été ajoutée une solution d'Aoa-Muc (**3**) (12,9 mg ; 0,00658 mmoles) dans 3,75 ml d'H<sub>2</sub>O. Le ballon a été placé dans la glace puis, sous agitation, 1,1 ml de TFA ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant 10 min dans la glace puis évaporée à sec. Le résidu a alors été repris dans 11,25 ml d'H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution a été ajusté à 4,5 avec une solution NaOH 1M. La solution a été agitée pendant 3 jours et le produit PADRE-Muc(Muc)Muc (**45**) a été purifié par HPLC sur une colonne C4 et lyophilisé. 5,1 mg (33 %) de produit ont été obtenus sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 32,34 min; ESI-MS: 7331,19 ± 0,69 [M] (calculé pour C<sub>339</sub>H<sub>504</sub>N<sub>96</sub>O<sub>103</sub>, [M] = 7732,10).

#### PADRE-Muc(MucTn)MucTn (41)

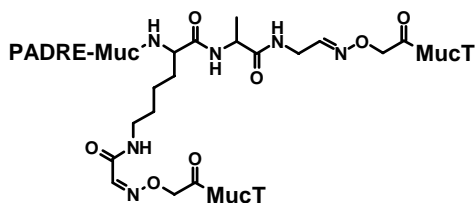


PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) (3,8 mg ; 0,00109 mmoles) a été ajouté à la solution d'Aoa-MucTn (**18**) (6 ml ; 0,00524 mmoles) placée dans un ballon. Le ballon a été placé dans la glace puis, sous agitation, 600 µl de TFA ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant 10 min dans la glace puis évaporée à sec. Le résidu a alors été repris dans 6 ml d'H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution a été ajusté à 4,5 avec une solution NaOH 1M. La solution a été agitée pendant 6 jours et le produit PADRE-Muc(MucTn)MucTn (**41**) a été purifié par HPLC sur une

colonne C4 et lyophilisé. 4,5 mg (53 %) de produit ont été obtenus sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 31,49 min; ESI-MS: 7738,38 ± 0,32 [M] (calculé pour C<sub>335</sub>H<sub>530</sub>N<sub>98</sub>O<sub>113</sub>, [M] = 7738,49).

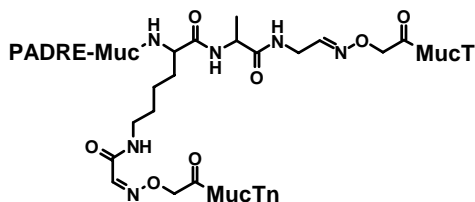
### PADRE-Muc(MucT)MucT (42)



PADRE-Muc(CHO)Acétal (**46**) (1,5 mg ; 0,00043 mmoles) a été ajouté à la solution d'Aoa-MucT (**19**) (3,8 ml ; 0,00147mmoles) placée dans un ballon. Le ballon a été placé dans la glace puis, sous agitation, 380 µl de TFA ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant 10 min dans la glace puis évaporée à sec. Le résidu a alors été repris dans 3,8 ml d'H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution a été ajusté à 4,5 avec une solution NaOH 1M. La solution a été agitée pendant 6 jours et le produit PADRE-Muc(MucT)MucT (**42**) a été purifié par HPLC sur une colonne C4 et lyophilisé. 1,4 mg (39 %) de produit ont été obtenus sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 30,39 min; ESI-MS: 8063,045 ± 1,25 [M] (calculé pour C<sub>347</sub>H<sub>550</sub>N<sub>98</sub>O<sub>123</sub>, [M] = 8062,77).

### PADRE-Muc(MucTn)MucT (43)



Padre-Muc(CHO)Acétal (**46**) (4,2 mg ; 0,00120 mmoles) en solution dans 4 ml de tampon acétate 1M pH 4,6 a été ajouté à la solution d'Aoa-MucTn (**18**) (5,19 ml ; 0,00340 mmoles) . Le mélange a été agité pendant 6 jours et le produit PADRE-Muc(MucTn)Acétal (**49**) a été purifié par HPLC sur une colonne C4 et lyophilisé après avoir ajouté la solution d'Aoa-MucT (**19**) (1 ml ; 0,00039 mmoles) aux fractions d'HPLC.



Le produit obtenu, difficilement manipulable, a été solubilisé dans 1,4 ml d'H<sub>2</sub>O et analysé par HPLC. Aoa-MucT (**19**) (2 ml ; 0,00077 mmoles) a alors été ajoutée à la solution. Celle-ci a été placée dans la glace puis, sous agitation, 320 µl de TFA ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant 10 min dans la glace puis évaporée à sec. Le résidu a alors été repris dans 3,2 ml d'H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution a été ajusté à 4,5 avec une solution NaOH 1M. La solution a été analysée par HPLC et le produit PADRE-Muc(MucTn)MucT (**43**) a été purifié par HPLC sur une colonne C4 et lyophilisé. 1,2 mg (13 %) de produit ont été obtenus sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 34,66 min; ESI-MS: 7900,34 ± 0,49 [M] (calculé pour C<sub>341</sub>H<sub>540</sub>N<sub>98</sub>O<sub>118</sub>, [M] = 7900,63).

### **III . 5 . Synthèse des peptides et glycopeptides Muc, MucTn et MucT utilisés pour les tests ELISA**

Les peptides et glycopeptides Muc, MucTn et MucT ont été préparés de la même façon que les peptides ou glycopeptides Aoa-Muc (**3**), Aoa-MucTn (**18**) et Aoa-MucT (**19**).

Muc : *Tr* (gradient A): 10,60 min; Maldi : 1885,93 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>80</sub>H<sub>127</sub>N<sub>25</sub>O<sub>28</sub>, [M] = 1885,93)

MucTn : *Tr* (gradient A): 12,51 min; Maldi : 2088,93 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>88</sub>H<sub>140</sub>N<sub>26</sub>O<sub>33</sub>, [M] = 2089,01)

MucT : *Tr* (gradient A): 11,09 min; Maldi : 2251,681 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>94</sub>H<sub>150</sub>N<sub>26</sub>O<sub>38</sub>, [M] = 2351,06)

### **III . 6 . Essais d'immunisation**

#### **III . 6 . A . Immunisation des souris**

Chacun des immunogènes (375 µg) a été dissous dans 1,5 ml de NaCl 150 mM. Pour chaque immunisation, 500 µl de la solution a été ajoutée à 500 µl de la solution d'alum. Le mélange a été agité pendant 30 min puis 500 µl de la solution NaCl 150 mM ont été ajoutés. 300 µl de la solution a été injectée en sous-cutané à chaque souris préalablement anesthésiée par inhalation d'éther. L'opération a été répétée 15 puis 30 jours après.

15 jours après la dernière immunisation, le sang a été prélevé dans le sinus rétro-orbital de chaque souris puis centrifugé. Les sérums sont séparés des globules rouges puis congelés à -20°C.

#### **III . 6 . B . Tests Elisa**

Les antigènes Muc, MucTn ou MucT (100 ng par puits) en solution dans le tampon carbonate 200 mM pH 9,6 (50µl) ont été incubés dans chaque puits des plaques de microtitration pendant la nuit. La préparation des plaques ainsi que la révélation des anticorps ont ensuite été réalisés comme précédemment avec les solutions de sérums dilués au 1/100.

## IV . Synthèses relatives aux perspectives concernant la géométrie des immunogènes non glycosylés

La synthèse des synthons nécessaires à la synthèse des chimères Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**) et (Muc)<sub>2</sub>Muc-PADRE (**51**) décrites dans la partie IV des « résultats et discussion » ainsi que la synthèse des chimères sont présentées dans cette partie.

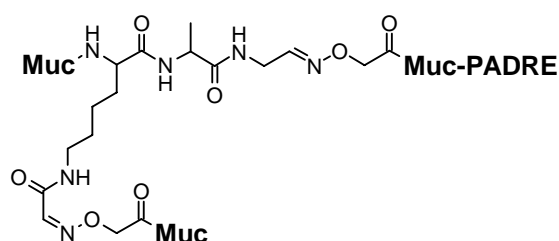
### Synthon Aoa-Muc-PADRE (**52**)

H<sub>2</sub>N-O-CH<sub>2</sub>-CO-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTAaKXVAAWTLKa-NH<sub>2</sub> (a: D-Ala; X: cyclohexylalanine)

L'acide 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminométhyl)-phenoxy acétique (270 mg ; 0,5 mmoles) a été couplé manuellement sur la résine aminométhyl-PEGA (substitution : 0,4 mmoles/g ; 2 g de résine humide) comme indiqué dans les procédures générales. L'élongation de la séquence Muc-PADRE a ensuite été réalisée selon la procédure générale en introduisant le dipeptide Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\Psi^{\text{Me, Me}}$  Pro)-OH à la place des deux résidus W<sup>7</sup>T<sup>8</sup> du peptide PADRE. Le rendement d'élongation est quantitatif. Le peptide-résine Muc-PADRE-Rink-PEGA (271 mg ; 0,061 mmoles) a ensuite été introduit dans une seringue équipée d'un fritté. Boc-Aoa-OH (58, mg ; 0,305 mmoles) a été couplé manuellement selon la procédure générale avec HATU (116 mg ; 0,305 mmoles) au lieu de HBTU. Le peptide résine a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2,5:2,5 (4 ml). Le peptide a ensuite été précipité et lavé avec de l'éther. 128 mg (soit un rendement de 65%) de produit brut ont ainsi été obtenus.

*Tr* (gradient A): 39,5 min; Maldi : 3222,51 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>144</sub>H<sub>232</sub>N<sub>42</sub>O<sub>42</sub>, [M] = 3221,73).

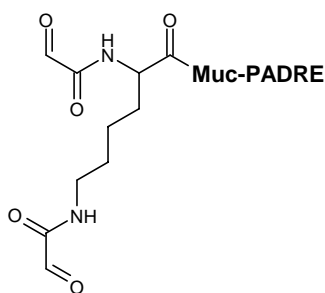
### Chimère Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**)



Aoa-Muc (**3**) (5,4 mg ; 0,0028 mmoles) a été ajouté à une solution de Muc(CHO)Acétal (**9**) (2 ml ; 0,0028 mmoles). Après une nuit d'agitation, le produit Muc(Muc)Acétal (**10**) a été purifié par HPLC. Aoa-Muc-PADRE (**52**) (1,3 mg ; 0,0004 mmoles) a été additionné aux fractions d'HPLC. Celles-ci ont été concentrées sous vide puis évaporées. Le produit obtenu a ensuite été solubilisé dans 2 ml d'H<sub>2</sub>O. 200 µl de TFA ont alors été ajoutés. La solution a été agitée dans la glace pendant 10 min puis évaporée et le résidu a été repris dans 2 ml d'H<sub>2</sub>O. Le produit Muc(Muc)Muc-PADRE (**50**) a été purifié par HPLC sur une colonne C4. 728 µg (soit un rendement de 3,5 %), de produit ont ainsi été obtenu sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 38,33 min; ESI-MS: 7330,06 ± 1,18 [M] (calculé pour C<sub>319</sub>H<sub>505</sub>N<sub>97</sub>O<sub>102</sub>, [M] = 7331,11).

### Synthon CHO(CHO)Muc-PADRE (**53**)



Une quantité approximativement estimée à 0,03 mmoles de peptide-résine Muc-PADRE-Rink-PEGA a été introduit dans une seringue équipée d'un fritté. Fmoc-Lys(Mtt)-OH (95 mg ; 0,152 mmoles) a été couplé manuellement selon la procédure générale. Le Fmoc a été éliminé par un traitement 20% de pipéridine dans la NMP (3 x 5 min) suivi par un lavage de la résine avec du DCM (3x). L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) donnant 0,0175 mmoles. Le groupe protecteur Mtt a été éliminé par un traitement TFA/DCM/TIS, 1:98:1 (~30 x 2 min, 2 ml, jusqu'à ce que la résine soit incolore) suivi d'un rinçage avec du DCM (3x). Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (34 mg ; 0,875 mmoles) a été couplée selon la procédure générale sur la moitié du peptide-résine. Le Fmoc sur chacune des deux sérines a été éliminé par un traitement 20% de pipéridine dans la NMP (3 x 5 min) suivi par un lavage de la résine avec du DCM (3x). L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) donnant 0,0171 mmoles, soit un rendement de 98%.

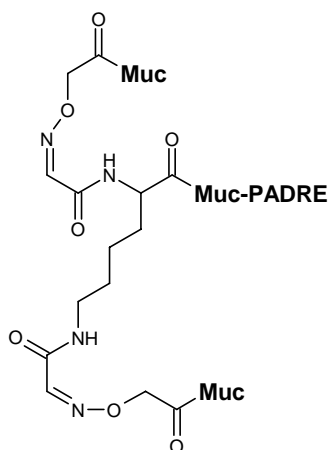
Le peptide-résine SK(S)-Muc-PADRE-Rink-PEGA (0,0085 mmoles) a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2,5:2,5 (2 ml). Le peptide a ensuite été précipité et lavé avec de l'éther. 18,7 mg (soit un rendement de 64%) de produit brut ont ainsi été obtenus.

SK(S)-Muc-PADRE : *Tr* (gradient A): 39,18 min; Maldi : 3451,40 (calculé pour C<sub>154</sub>H<sub>250</sub>N<sub>44</sub>O<sub>46</sub>, [M] = 3451,86).

Le peptide SK(S)-Muc-PADRE (18,7 mg ; 0,0054 mmoles) a été mis en solution dans 12 ml d'H<sub>2</sub>O. Le pH a ensuite été ajusté à 6 avec de l'acide acétique. NaIO<sub>4</sub> (4,6 mg ; 0,011 mmoles) a été ajouté à la solution qui a été agitée pendant 15 min. Le produit CHO(CHO)Muc-PADRE (**53**) ainsi obtenu a été purifié sur une colonne Sep-Pack C18.

*Tr* (gradient A): 41,05 min; Maldi : 3392,55 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>152</sub>H<sub>240</sub>N<sub>42</sub>O<sub>46</sub>, [M] = 3389,77).

### Chimère (Muc)<sub>2</sub>Muc(**51**)



Aoa-Muc (**3**) (6,2 mg ; 0,0032 mmoles) a été ajouté à une solution de CHO(CHO)Muc-PADRE(**53**) (1 ml ; 0,00045 mmoles). Après 6 jours d'agitation, la chimère (**51**) a été purifiée par HPLC sur une colonne C4. 473 µg (soit un rendement de 14,4%), de produit ont ainsi été obtenu sous forme d'une poudre cotonneuse blanche.

*Tr* (gradient A): 37,73 min; ESI-MS: 7274,96 ± 0,85 [M] (calculé pour C<sub>316</sub>H<sub>494</sub>N<sub>94</sub>O<sub>104</sub>, [M] = 7275,98).

## **V . Synthèses relatives aux perspectives concernant la synthèse de nouvelles chimères incluant des liaisons hydrazide**

### **Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (55)**



Une fraction du peptide-résine Fmoc-Y-Muc-PAM-PEGA (**56**) obtenu après l'élongation réalisée à partir de l'acide-amino-résine A-PAM-PEGA (**6**) a été introduite dans une seringue équipée d'un fritté. Après lavage de la résine avec la NMP (3x), le Fmoc a été éliminé par un traitement 20% de pipéridine dans la NMP (1,5 ml), 3 x 5 min, suivi par un lavage de la résine avec du DCM (3x). L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) donnant 0,00523 mmoles. Après lavage de la résine avec du DCM (3x), les chaînes latérales ont été déprotégées par un traitement TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2,5:2,5 pendant 2 h. La résine a ensuite été lavée avec du DCM (3x) et de la NMP (3x) puis neutralisée avec DIEA/NMP 1:9 (3 ml), 3 x 5 min.

La résine a ensuite été rincée avec H<sub>2</sub>O (3x) puis une solution d'hydrazine 10 % (2ml) a été ajoutée. Le milieu a été agité pendant deux minutes puis filtré et la résine a été lavée avec H<sub>2</sub>O (3x). L'ensemble des filtrats a été rassemblé et évaporé sous vide. Le résidu a ensuite été solubilisé dans 10 ml d'eau et purifié par HPLC. 6,2 mg de produits, soit un rendement de 58% ont été obtenus.

*Tr* (gradient A): 12,38 min; Maldi : 2063,28 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>89</sub>H<sub>138</sub>N<sub>28</sub>O<sub>29</sub>, [M] = 2063,02).

### **Muc-CO-CH<sub>3</sub> (56)**



Sur une résine NovaTag® (189 mg ; 0,55 mmoles/g), le groupement Fmoc a été éliminé en présence de 20 % de pipéridine dans la NMP, puis le premier couplage avec Fmoc-Thr(*t*Bu) a été effectué en présence de HATU comme agent de couplage. Le reste de l'élongation a été réalisée selon les procédures générales avec un rendement de 92 %. La proline *N*-terminale a été introduite sous forme de Boc-Pro. Le Mmt a ensuite été éliminé par un traitement HOBt 1M dans un mélange TFE/DCM, 5:5. L'acide pyruvique (20 éq) a ensuite

été couplé avec DCC/NHS (20 éq) pendant une nuit. Le peptide-résine a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec TFA/H<sub>2</sub>O, 95:5 (1 ml). Le peptide a ensuite été précipité et lavé avec de l'éther et purifié par HPLC avec un rendement de 70%.

*Tr* (gradient A): 15,85 min; Maldi : 1927,85 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>82</sub>H<sub>130</sub>N<sub>26</sub>O<sub>28</sub>, [M] = 1926,96).

### **Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (57) et Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CHO (58)**

Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (57) : APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CHO (58) : APPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-NH-CH<sub>2</sub>-CHO

Une fraction d'un peptide-résine Fmoc-A-Muc-PAM-PEGA obtenu après l'élongation réalisée sur l'acide-amino-résine A-PAM-PEGA (6) a été introduite dans une seringue équipée d'un fritté. Après lavage de la résine avec la NMP (3x), le Fmoc a été éliminé par un traitement 20% de pipéridine dans la NMP (1,5 ml), 3 x 5 min, suivi par un lavage de la résine avec du DCM (3x). L'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine a été mesurée à 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) donnant 0,00435 mmoles. L'aminolyse a ensuite été réalisée comme décrit précédemment.

Le peptide Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ainsi obtenu a été purifié par HPLC. 4 mg de produits ont été obtenus soit un rendement de 46 %.

Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (57) : *Tr* (gradient A): 11,62 min; Maldi : 2045,04 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>87</sub>H<sub>141</sub>N<sub>27</sub>O<sub>30</sub>, [M] = 2044,03)

Pour les différents essais de formation d'hydrazone, le peptide a ensuite été traité avec une solution de TFA 10 % pendant 10 min dans la glace. La solution a été évaporée. Le résidu a été solubilisé dans H<sub>2</sub>O et immédiatement mis en réaction.

Muc-NH-CH<sub>2</sub>-CHO (58) : *Tr* (gradient A): 8,53 min; Maldi : 1998,96 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>85</sub>H<sub>135</sub>N<sub>27</sub>O<sub>29</sub>, [M] = 1997,99)

### **Muc-CO-CHO (59)**

PPAHGVTSAPDTRPAPGST-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CHO

Sur une résine NovaTag® (189 mg ; 0,55 mmoles/g), le groupement Fmoc a été éliminé en présence de 20 % de pipéridine dans la NMP, puis le premier couplage avec Fmoc-Thr(*t*Bu) a été effectué en présence de HATU comme agent de couplage. Le reste de l'élongation a été réalisé selon les procédures générales avec un rendement de 92%. Le Mmt a ensuite été éliminé par un traitement HOBt 1M dans un mélange TFE/DCM, 5:5. La sérine (5 éq) a ensuite été couplé avec HBTU (5 éq) et DIEA (6 éq) pendant la nuit. Le peptide-résine a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2,5:2,5 (1 ml). Le peptide a ensuite été précipité, lavé avec de l'éther, filtré et séché. Le peptide (20 mg ; 0,01 mmoles) a ensuite été mis en solution dans 15 ml d'eau. NaIO<sub>4</sub> (4,28 mg, 0,02 mmoles) a été ajouté à la solution qui est agitée pendant 10 min. Le produit a ensuite été purifié par HPLC. 12,4 mg de produit ont été obtenus, soit un rendement de 62 %.

*Tr* (gradient A): 8,33 min; Maldi : 1913,90 [M + H<sup>+</sup>] (calculé pour C<sub>81</sub>H<sub>128</sub>N<sub>26</sub>O<sub>28</sub>, [M] = 1912,94).

### **CHO-CO-Muc (60)**

CHO-CO-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA

L'élongation de la séquence SPPAHGVTSAPDTRPAPGST a été réalisée sur une résine Fmoc-Ala-Wang (250 mg ; substitution : 0,44 mmoles/g) avec un rendement de 95%. Le peptide-résine a été lavé avec du DCM (3x) et traité avec TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, 95:2,5:2,5 (1 ml). Le peptide a ensuite été précipité et lavé avec de l'éther. 14 mg de produit brut ont ainsi été obtenus. Le peptide (12,1 mg ; 0,006 mmoles) a été mis en solution dans 15 ml d'eau. NaIO<sub>4</sub> (2,5 mg, 0,012 mmoles) a ajouté a la solution qui est agitée pendant 10 min. Le produit a ensuite été purifié par HPLC. 6,2 mg de produit ont été obtenus, soit un rendement de 52 %.

*Tr* (gradient A): 14,19 min; ESI-MS: 1942,27 [M] (calculé pour C<sub>82</sub>H<sub>127</sub>N<sub>25</sub>O<sub>30</sub>, [M] = 1941,92).



### Y-Muc=Muc (61)



Une solution du peptide hydrazide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) (460 µl, 2mg/ml, 2 éq) a été ajoutée à une solution du peptide cétoaldéhyde CHO-CO-Muc (**60**) (230 µl, 2mg/ml, 1 éq). Le pH a été ajusté à 4 avec 49,5 µl d'une solution AcOH 0,2 %. La réaction a été suivie par HPLC pendant 15 jours.

*Tr* (gradient F): 29,48 min; ESI-MS: 3989,8 [M] (calculé pour C<sub>171</sub>H<sub>263</sub>N<sub>53</sub>O<sub>58</sub>, [M] = 3989,29).

### Réduction de l'hydrazone



NaBH<sub>3</sub>CN (500µg, 80 éq) a été ajouté à 300 µl de la solution de ligation. La solution a été agitée pendant 3h et le produit a été analysé par HPLC.

*Tr* (gradient F): 29,14 min; ESI-MS: 3991,3[M] (calculé pour C<sub>171</sub>H<sub>265</sub>N<sub>53</sub>O<sub>58</sub>, [M] = 3991,31)

### Y-Muc=(CH<sub>3</sub>)Muc (62)



Une solution du peptide hydrazide Y-Muc-NH-NH<sub>2</sub> (**55**) (500 µl, 4mg/ml, 2 éq) a été ajoutée à une solution du peptide cétone Muc-CO-CH<sub>3</sub> (**56**) (250 µl, 4mg/ml, 1 éq). 750 µl de tampon acétate 0,1M pH 5,5 ont été ajoutés. La réaction a été suivie par HPLC. Elle est complète après 5 jours d'agitation.

*Tr* (gradient F): 18,64 min; ESI-MS: 3972,62 [M] (calculé pour C<sub>171</sub>H<sub>266</sub>N<sub>54</sub>O<sub>56</sub>, [M] = 3971,25)

# **Bibliographie**

- 
- <sup>1</sup> W. Pigman, J. Moshera, M. Weiss, G. Tettamanti. The occurrence of repetitive sequences in bovine submaxillary glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **1973**, 32, 148-154.
- <sup>2</sup> N. Jentoft. Why are protein O-glycosylated ? *Trends Biochem. Sci.*, **1990**, 15, 291-294.
- <sup>3</sup> a) K.G. Ten Hagen, T.A. Fritz, L.A. Tabak. All in the family : The UDP-GalNAc polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferases. *Glycobiology*, **2003**, 13, 1R-6R.
- b) H. Wang, K. Tachibana, Y. Zhang, H. Iwasaki, A. Kameyama, L. Cheng, J. Guo, T. Hiruma, A. Togoyachi, T. Kudo, N. Kikuchi, H. Narimatsu. Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 300, 738-744.
- b) L. Cheng, K. Tachibana, H. Iwasaki, A. Kameyama, Y. Zhang, T. Kubota, T. Hiruma, T. Kudo, J. Guo, H. Narimatsu. Characterization of a novel UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. *FEBS Lett.*, **2004**, 566, 17-24.
- <sup>4</sup> a) L. Kinarsky, M. Nomoto, Y. Ikematsu, H. Hassan, E.P. Benett, R.L. Cerny, H. Clausen, M.A. Hollingsworth, S. Sherman. Structural analysis of peptide substrates for mucin-type O-glycosylation. *Biochemistry*, **1998**, 37, 12811-12817.
- b) L. Kinarsky, G. Suryanarayanan, O. Prakash, H. Paulsen, H. Clausen, F.G. Hanisch, M.A. Hollingsworth, S. Sherman. Conformational studies on the MUC1 tandem repeat glycopeptides : implication for the enzymatic O-glycosylation of the mucin protein core. *Glycobiology*, **2003**, 13, 929-939.
- <sup>5</sup> A. Gerken. Kinetic modeling confirms the biosynthesis of mucin Core 1 ( $\beta$ -Gal(1-3)  $\alpha$ -GalNAc-O-Ser/Thr) O-glycan structures are modulated by neighboring glycosylation effects. *Biochemistry*, **2004**, 43, 4137-4142.
- <sup>6</sup> F.G. Hanisch, S. Müller. MUC1 : the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*, **2000**, 10, 439-449.
- <sup>7</sup> S.V. Litvinov, J. Hilken. The epithelial sialomucin, epsialin, is sialylated during recycling. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 21364-21371.
- <sup>8</sup> M. Shimizu, K. Yamauchi. Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. *J. Biochem.*, **1982**, 91, 515-524.
- <sup>9</sup> a) S.J. Gendler, C.A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E.N. Lalani, D. Wilson. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 15286-15293.
- b) M.S. Lan, S.K. Batra, W.N. Qi, R.S. Metzgar, M.A. Hollingsworth. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 15294-15299.
- c) M.J. Ligtenberg, H.L. Vos, A.M. Gennissen, J. Hilken. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 5573-5578.

- d) D.H. Wreschner, M. Hareuveni, I. Tsarfaty, N. Smorodinsky, J. Horev, J. Zaretsky, P. Kotkes, M. Weiss, R. Larhe, A. Dion, I. Keydar. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences : Differential splicing may generate multiple protein forms. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 189, 463-473.
- <sup>10</sup> I. Brockhausen, J.M. Yang, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233, 607-617.
- <sup>11</sup> F.G. Hanisch, T.R. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic. MUC1 glycoforms in breast cancer. Cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 236, 318-327.
- <sup>12</sup> a) K.N. Syrigos, A.J. Karayiannakis, A. Zbar. Mucins as immunogenic targets in cancer. *Anticancer Res.*, **1999**, 19, 5239-5244.
- b) J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D.W. Miles, M. Dalziel. MUC1 and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1455, 301-313.
- c) S.E. Baldus, K. Engelmann, F.G Hanisch. MUC1 and the MUCs : A family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit. Rev. Clin. Labor. Sci.*, **2004**, 41, 189-231.
- d) B. Acres, J.-A. Limacher. MUC1 as target antigen for cancer immunotherapy. *Expert Rev. Vaccines*, **2005**, on-line.
- <sup>13</sup> S. Von Mensdorff-Pouilly, M.M. Gourevitch, P. Kenemans, A.A. Verstraeten, S.V. Livtinov, G.J. van Kamp, S. Meijer, J. Vermorken, J. Hilgers. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur. J. Cancer*, **1996**, 32A, 1325-1331.
- <sup>14</sup> J.S. Goydos, E. Elder, T.L. Whiteside, O.J. Finn, M.T. Lotze, A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J. Surg. Res.*, **1996**, 63, 298-304.
- <sup>15</sup> S. Zhang, L.A. Graeber, F. Helling, G. Ragupathi, S. Adluri, K.O. Lloyd, P.O. Livingston. Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in Mice. *Cancer Res.*, **1996**, 56, 3315-3319.
- <sup>16</sup> T. Gilewski, S. Adluri, G. Ragupathi, S. Zhang, T.-J. Yau, K. Panageas, M. Moynahan, A. Houghton, L. Norton, P.O. Livingston. Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) Keyhole Limpet Hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin. Cancer. Res.*, **2000**, 6, 1693-1701.
- <sup>17</sup> D.H. Dube, C.R. Bertozzi. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutic and diagnostics. *Nature Reviews, Drug Discov.*, **2005**, 477-488.
- <sup>18</sup> a) R.M. Ratcliffe, D.A. Baker, R.U. Lemieux. Synthesis of the T[ $\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\alpha$ -D-GalNAc]-antigenic determinant in a form useful for the preparation of an effective artificial antigen and the corresponding immunoabsorbent. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 93, 35-41.
- b) P.Y. Fung, M. Madej, R.R. Koganty, B.M. Longenecker. Active specific immunotherapy of a murine mammary adenocarcinoma using a synthetic tumor-associated glycoconjugate. *Cancer Res.*, **1990**, 50, 4308-4314.
- c) T. Toyokuni, S.-I. Hakomori, A.K. Singhal. Synthetic carbohydrate vaccines, synthesis and immunogenicity of Tn antigen conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, **1994**, 2, 1119-1132.

- 
- <sup>19</sup> M.-P. Schutze, C. Leclerc, M. Jolivet, F. Audibert, L. Chedid. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.*, **1985**, 135, 2319-2322.
- <sup>20</sup> J.P. Tam. Synthetic peptide vaccine design : Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 5409-5413.
- <sup>21</sup> W.G. Bessler, M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K.-H. Wiesmüller, G. Jung. Synthetic lipopeptide analogues of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J. Immunol.*, **1985**, 135, 1900-1905.
- <sup>22</sup> J.A. Berzofsky. Mechanism of T cell recognition with application to vaccine design. *Mol. Immunol.*, **1991**, 28, 217-233.
- <sup>23</sup> S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzène. Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen : A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine. *J. Pept. Res.*, **1997**, 49, 620-625.
- <sup>24</sup> R. Lo-Man, S. Bay, S. Vichier-Guerre, E. Dériaud, D. Cantacuzène, C. Leclerc. A fully synthetic immunogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy. *Cancer Res.*, **1999**, 1520-1524.
- <sup>25</sup> T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons. Towards a fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines : synthesis and immunological evaluation of a lipidated glycopeptide containing the tumor-associated Tn antigen. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **2005**, 44, on-line.
- <sup>26</sup> S.D. Kuduk, J.B. Schwarz, X.-T. Chen, P.W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P.O. Livingston, S.J. Danishevsky. Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens : The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12474-12485.
- <sup>27</sup> R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, S. Bay, E. Dériaud, D. Cantacuzène, C. Leclerc. Anti-tumour immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J. Immunol.*, **2001**, 166, 2849-2854.
- <sup>28</sup> R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, R. Perraut, E. Dériaud, V. Huteau, L. Benmohamed, O.M. Diop, S. Bay, C. Leclerc. A fully synthetic therapeutic candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 4987-4994.
- <sup>29</sup> S. Vichier-Guerre, R. Lo-Man, L. BenMohamed, E. Dériaud, S. Kovats, C. Leclerc, S. Bay. Induction of carbohydrate specific antibodies in HLA-DR transgenic mice by a synthetic glycopeptide : a potential anti-cancer vaccine human use. *J. Peptide Res.*, **2003**, 117-124.
- <sup>30</sup> a) C. Broke, H. Kunz. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 3085-3112.
- b) S. Dziadek, H. Kunz. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens for the development of tumor-selective vaccines., *Chem. Rec.*, **2004**, 3, 308-321
- <sup>31</sup> a) O. Seitz, H. Kunz. A novel allylic anchor for solid-phase synthesis. Synthesis of protected and unprotected O-glycosylated mucin-type glycopeptides. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **1995**, 34, 803-805.

- 
- b) B. Liebe, H. Kunz. Solid-Phase of a sialyl-Tn-Glycoundecapeptide of the MUC repeating unit. *Helv. Chim. Acta*, **1997**, 80, 1473-1482.
- c) S. Dziadek, C. Broke, H. Kunz. Biomimetic synthesis of the tumor-associated (2,3)-sialyl-T and its incorporation into glycopeptide antigens from the mucins MUC1 and MUC4. *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 4150-4162.
- <sup>32</sup> S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz. Towards the development of a antitumor vaccines : a synthetic conjugate of a tumor-associated MUC1 glycopeptide antigen and a tetanus toxin epitope. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **2001**, 40, 366-369.
- <sup>33</sup> E. Kagan, G. Ragupathi, S.S. Yi, C.A. Reis, J. Gildersleeve, D. Kahne, H. Clausen, S.J. Danishefsky, P.O. Livingston. Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn. *Cancer Immunol. Immunother.*, **2005**, 54, 424-430.
- <sup>34</sup> S. Müller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A.M. Lawson, F.G. Hanisch. Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-association MUC1. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 24780-24793.
- <sup>35</sup> S. Müller, K. Alving, J. Peter-Katalinics, N. Zachara, A.A. Goolez, F.G. Hanish. High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D Breast Cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 18165-18172.
- <sup>36</sup> a) U. Karsten, C. Diotel, G. Klich, H. Paulsen, S. Goletz, S. Müller, F.-G. Hanish. Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat is mediated by site-specific glycosylation. *Cancer Res.*, **1998**, 58, 2541-2549.
- b) U. Karsten, N. Serttas, H. Paulsen, A. Danielczyk, S. Goletz. Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumour-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). *Glycobiology*, **2004**, 681-692.
- <sup>37</sup> S. von Mensdorff-Pouilly, E. Petrakou, P. Kenemans, K. van Uffelen, A.A. Verstaeten, F.G.M. Snnijdewint, G.J. van Kamp, D.J. Schol, C.A. Reis, M.R. Price, P.O. Livingston, J. Hilgers. Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and N-Acetylgalactosamine. *Int. J. Cancer*, **2000**, 86, 702-712.
- <sup>38</sup> S.M.J. Scanlon, S.D. Morley, D.E. Jackson, M.R. Price, S.J. Tendler. Structural and computational investigations of the conformation of antigenic peptide fragments of human polymorphic epithelial mucin. *Biochem. J.*, **1992**, 284, 137-144.
- <sup>39</sup> J. Shuman, A.P. Campbell, R.R. Koganty, B.M. Longenecker. Probing the conformational and dynamical effects of O-Glycosylation within the immunodominant region of a MUC1 peptide tumor antigen. *J. Pept. Res.*, **2003**, 61, 91-108.
- <sup>40</sup> R.B. Merrifield. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
- <sup>41</sup> M. Meldal. Properties of solid supports. *Methods Enzymol.*, **1997**, 289, 83-104.
- <sup>42</sup> S.Y. Han, Y.A. Kim. Recent development of peptide and coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 2447-2467.

- 
- 43 F. Albericio. Orthogonal protecting groups for  $N^{\alpha}$ -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers* **2000**, 55, 123-139.
- 44 Y. Nishiuchi, T. Inui, H. Nishio, J. Bodi, T. Kimura, F.I. Tsuji, S. Sakakibara. Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 13549-13554.
- 45 a) B.L. Bray. Large-scale manufacture of peptide therapeutic by chemical synthesis. *Nature Reviews, Drug Discovery*, **2004**, 2, 587-593.  
b) T. Bruckdorfer, O. Marder, F. Albericio. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr. Pharm. Biotech.*, **2004**, 5, 29-43.
- 46 T.W. Muir. A chemical approach to the construction of multimeric protein assemblies. *Structure*, **1995**, 3, 649-652.
- 47 M. Schnölzer, S.B.H. Kent. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides : backbone-engineered HIV protease. *Science*, **1992**, 256, 221-225.
- 48 a) P.E. Dawson, S.B.H. Kent. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 923-960.  
b) B. L. Nilson, M.B. Soellner, R.T. Raines. Chemical synthesis of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2005**, 34, 91-118.
- 49 H.C. Hang, C.R. Bertozzi. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 727-736.
- 50 T.P. King, S.W. Zhao, T. Lam. Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. *Biochemistry*, **1986**, 25, 5774-5779.
- 51 H.F. Gaertner, K. Rose, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, R.E. Offord. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjugate Chem.*, **1992**, 3, 262-268.
- 52 K. Rose. Facile synthesis of homogeneous artificial protein. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 30-33.
- 53 F. Wahl, M. Mutter. Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 6861-6864.
- 54 D.R. Englebretsen, B.G. Garnham, D.A. Bergman, P.F. Alewood. A novel thioether linker : Chemical synthesis of a HIV-1 protease analogue by thioether ligation. *Tetrahedron. Lett.*, **1995**, 36, 8871-8874.
- 55 A. Nefzi, X. Sun, M. Mutter. Chemoselective ligation of multifunctional peptides to topological templates via thioether formation for TASP synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 229-230.
- 56 C.F. Liu, J.P. Tam. Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 6584-6588.
- 57 C.F. Liu, C. Rao, J.P. Tam. Orthogonal ligation of unprotected peptide segments through pseudoproline formation for the synthesis of HIV-1 protease analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 307-312.

- 58 P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B.H. Kent. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **1994**, 266, 776-779.
- 59 T.W. Muir, D. Sondhi, P.A. Cole. Expressed protein ligation : a general method for protein engineering. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 6705-6710.
- 60 E. Saxon, J. I. Armstrong, C.R. Bertozzi. A « traceless » Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.*, **2000**, 2141-2143.
- 61 B. L. Nilson, L.L. Kiessling, R.T. Raines. Staudinger ligation : a peptide from thioester and azide. *Org. Letters*, **2000**, 1341-1941.
- 62 B.L. Nilson, R.J. Hondal, M.B. Soeller, R.T. Raines. Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 5268-5289.
- 63 L.E. Canne, A.R. Ferré-D'amaré, S.K. Burley, S.B.H. Kent. Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein : cMyc-Max. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 2998-3007.
- 64 Z. Miao, J.P. Tam. Bidirectional tandem pseudoproline ligations of proline-rich helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 4253-4260.
- 65 D.H. Bang, S.B.H. Kent. A one-pot total synthesis of crambin. *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.*, **2004**, 43, 2534-2538.
- 66 G.G. Kochendoerfer, S.-Y. Chen, F. Mao *et al.* Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*, **2003**, 299, 884-887.
- 67 M. Mutter, S.A. Vuillemer. A chemical approach to protein design. Template assembled synthetic proteins. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28,535-554.
- 68 P.E. Dawson, S.B.H. Kent. Convenient total synthesis of a 4-helix TASP molecule by chemoselective ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7263-7266.
- 69 H.K. Rau, W. Haehnel. Design, Synthesis, and properties of a novel cytochrome *b* model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 468-476.
- 70 M.N. Mathieu, J.D. Wade, Y.-Y. Tan, R.J. Summers, G.W. Tregear. Novel strategy for the synthesis of template-assembled analogues of rat relaxin. Novel strategy for the synthesis of template-assembled analogues of rat relaxin. *J. Peptide Sci.*, **2000**, 6, 235-242.
- 71 G.G. Kochendoerfer, J.M. Tarck, S. Cressman. Total chemical synthesis of a 27 kDa TASP protein derived from the Mscl ion channel of *M. tuberculosis* by ketoxime-forming ligation. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 474-480.
- 72 D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 5730-5739.
- 73 P. Dumy, I.M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter. A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron lett.*, **1995**, 1255-1258.
- 74 J. Shao, J. P. Tam. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimer with oxime, hydrazone and thiazolidine. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3893-3899.



- 75 K. Rose, W. Zeng, P.-O. Regamey, I.V. Chernushevich, K.G. Standing, H.F. Gaertner. Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkage. *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 552-556.
- 76 W. Zheng, D.C. Jackson, J. Murray, K. Rose, L.E. Brown. Totally synthetic lipid-containing polyoxime peptide constructs are potent immunogens. *Vaccine*, **2000**, 1031-1039.
- 77 E.H. Nardin, J.M. Calvo-Calle, G.A. Oliveira, R.S. Nussenzweig, M. Schneider, J.M. Tiercy, L. Loutan, D. Hochstrasser, K. Rose. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types *J. Immunol.* **2001**, 166, 481-489.
- 78 O. Melnyk, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, H. Gras-Masse. Functionalization of peptides and proteins by aldehydes or keto groups. *Biopolymers (Peptide science)*, **2000**, 55, 165-186.
- 79 K.F. Geoghegan, J.G. Stroh. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-aminoalcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.*, **1992**, 3, 138-146.
- 80 J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen, Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 2303-2306.
- 81 J.C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen. A new amino acid derivative with a masked side-chain aldehyde and its use in peptide synthesis and chemoselective ligation. *J. Peptide. Sci.* **2001**, 537-551.
- 82 L. Zhang, T.R. Torgerson, X.-Y. Liu, S. Timmons, D. Colosia, J. Hawiger, J.P. Tam. Preparation of functionally active cell-permeable peptides by single-step ligation of two peptide modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 9184-9189.
- 82bis S.Far, O.Melnyk. A novel  $\alpha,\alpha'$ -diaminoacetic acid derivative for the introduction of the  $\alpha$ -oxo aldehyde functionality into peptides. *Tetrahedron lett.* ; **2004**, 45, 1271-1273.
- S.Far, O.Melnyk. Synthesis of glyoxylyl peptides using a phosphine labile  $\alpha,\alpha'$ -diaminoacetic acid derivative. *Tetrahedron lett.* ; **2004**, 45, 7163-7165.
- 83 O. Melnyk, J.-S. Fruchart, C. Grandjean, H. Gras-Masse. Tartric acid-based linker for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide  $\alpha$ -oxo aldehydes. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4153-4160.
- 84 K.J. Jensen, J. Alsina, M.F. Songster, J. Vagner, F. Albericio, G. Barany. Backbone Amide Linker (BAL) strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 5441-5452.
- 85 F. Guillaumie, J.C. Kappel, N.M. Kelly, G. Barany, K.J. Jensen. Solid-phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes from amino acetals anchored to a backbone amide linker (BAL) handle. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 6131-6135.
- 86 A.R. Mitchell, B.W. Erickson, M.N. Ryabtsev, R.S. Hodges, R.B. Merrifield. Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 10, 7357-7362.
- 87 D. Lelièvre, H. Chabane, A. Delmas. Simple and efficient solid-phase synthesis of unprotected peptide aldehyde for peptide segment ligation. *Tetrahedron lett.*, **1998**, 39, 9675-9678.

- 88 D. Lelièvre, O. Turpin, S. El Kazzouli, A. Delmas. Influence of polar support for the synthesis of large C-terminal peptide aldehyde : application to chemoselective ligation. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5525-5533
- 89 E. Nicolas, J. Clemente, T. Ferrer, F. Albericio, E. Giralt. The Use of the Nbb-Resin for the solid-phase synthesis of peptide alkylesters and alkylamides. Synthesis of Leuprolide. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 3179-3194.
- 90 L.A. Marcaurelle, L.S. Mizoue, J. Wilken, L. Oldham, S.B.H. Kent, T.M. Handel, C.R. Bertozzi. Chemical synthesis of lymphotactin : a glycosylated chemokine with a C-terminal mucin-like domain. *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 1129-1132
- 91 L.A. Marcaurelle, C.R. Bertozzi. Direct incorporation of unprotected ketone groups into peptides during solid-phase synthesis : application to the one-step modification of peptides with two different biophysical probes for FRET. *Tetrahedron. Lett.*, **1998**, *39*, 7279-7282.
- 92 K. Rose, L.A. Vilaseca, R. Werlen, A. Meunier, I. Fisch, R.M. Jones, R.E. Offord. Preparation of well-defined protein conjugates using enzyme-assisted reverse proteolysis. *Bioconjugate Chem.* , **1991**, *2*, 154-159.
- 93 J. Brask, K.J. Jensen. Carbopeptides : chemoselective ligation of peptide aldehyde to an aminoxy-functionalized D-Galactose template. *J. Peptide Sci.*, **2000**, 290-299.
- 94 T. Horn, B.-C. Lee, K.A. Dill, R.N. Zuckermann. Incorporation of selective functionalities into peptoids via solid-phase submonomeres synthesis. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 428-435.
- 95 D. Bonnet, C. Rommens, H. Gras-Mass, O. Melnyk. Chemoselective acylation of hydrazinopeptides : a novel and mild method for the derivatization of peptides with sensitive fatty acids. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 45-48.
- 96 C. Klinguer, O. Melnyk, E. Loing, H. Gras-Masse. Synthesis of hydrazinopeptides using solid phase *N*-amination. Application to chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* , **1996**, *37*, 7259-7262.
- 97 H.F. Gaertner, R.E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, K. Rose. Chemo-enzymatic backbone engineering of proteins. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 7224-7230.
- 98 I. Lang, N. Donzé, P. Garrouste, P. Dumy, M. Mutter. Chemoselective addressable HCAN building blocks in peptide synthesis : L-Homocanaline derivatives. *J. Peptide Sci.*, **1998**, *4*, 72-80.
- 99 J.C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen. Preparation of *O*-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry. *J. Peptide Sci.*, **1999**, *5*, 582-592..
- 100 R.G. Spiro. The structure of the disaccharide unit of the renal glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem.*, **1967**, *242*, 4813-4823.
- 100bis H. Lis, N. Sharon. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 1-27.
- 101 L.A. Marcaurelle, C.R. Bertozzi. Recent advances in the chemical synthesis of mucin-like glycoproteins. *Glycobiology*, **2002**, 69R-77R.
- 102 a) H. Kunz. Synthesis of glycopeptides, partial structures of biological recognition components. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **1987**, *26*, 294-308.

- 
- b) O. Seitz, I. Heinemann, A. Mattes, H. Waldmann. Synthetic peptide conjugates-tailormade probes for the biology of protein modification and protein processing. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2247-2277.
- <sup>103</sup> a) H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz. Synthesis of glycopeptides containing carbohydrate and peptides recognition motif. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4495-4537. b) G. Arsequell, G. Valencia. O-glycosyl  $\alpha$ -amino-acids as building blocks for glycopeptide synthesis. *Tetrahedron asymmetry*, **1997**, 8, 2839-2876.
- <sup>104</sup> H. Paulsen, C. Kolar, W. Stenzel. Synthese  $\alpha$ -glycosidisch verknüpfte Disaccharide der 2-Amino-2-desoxy-D-galactopyranose. *Chem. Ber.*, **1978**, 11, 2358-2369.
- <sup>105</sup> R.U. Lemieux, R.M. Ratcliffe. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244.
- <sup>106</sup> B. Ferrari, A.A. Pavia. Artificial carbohydrate : the synthesis of glycopeptidic haptens with Tn specificity. *Bioorg. Chem.*, **1982**, 11, 85-95.
- <sup>107</sup> H. Kunz, S. Birnbach. Synthese von O-Glycopeptiden des Tumorassoziierten Tn- und T-antigen-Typs und deren Anknüpfung an Rinderserumalbumin. *Angew. Chem.*, **1986**, 4, 354-355.
- <sup>108</sup> M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz. The (2-phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-(PTMSEL)-linker in the synthesis of glycopeptide partial structures of complex cell surface glycoproteins. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 6018-6030.
- <sup>109</sup> a) E. Meinjohanns, M. Meldal. Efficient syntheses of core 1, core 2, core 3, and core 4 building blocks for SPPS of mucin O-Glycopeptides based on the N-Dts-method. A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1996**, 985-993.
- b) N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock. Synthesis of glycopeptide sequences of repeating units of the mucins MUC2 and MUC3 containing oligosaccharide side-chains with core 1, core 2, core 3, core 4 and core 6 structure. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1997**; 2359-2368.
- <sup>110</sup> J.B. Schwarz, S.D. Kuduk, X.T. Chen, D. Sames, P.W. Glunz, S.J. Danishefsky. A broadly applicable method for the efficient synthesis of  $\alpha$ -O-Linked glycopeptides and clustered sialic acid residues. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2662-2673.
- <sup>111</sup> H.J.M. Gilson, L. Qiao, W. Fitz, C.-H. Wong. Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrate mimetics. *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 443-473.
- <sup>112</sup> R.G. Gallego, G. Dudziak, U. Kragl, C. Wandrey, J.P. Kameling, J.F.G. Vliegthart. Enzymatic synthesis of the core-2 sialyl lewis X O-glycan on the tumor-associated MUC1a' peptide. *Biochimie*. **2003**, 85, 275-286.
- <sup>113</sup> A. Leppänen, P. Mehtas, Y.-B. ouyang, T. Ju, J. Helin, K. L. Moores, I. van Die, W. M. Canfield, R. P. McEver, R. D. Cummings. A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 24838-24848.
- <sup>114</sup> O. Seitz, C.-H. Wong. Chemoenzymatic solution- and solid-phase synthesis of O-glycopeptides of the mucin domain of MadCAM-1. A general route to O-LacNac, O-sialyl-LacNac, and O-sialyl-lewis-X peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8766-8776.

- 115 S. Cao, F.D. Tropper, R. Roy. Stereoselective phase transfer catalysed syntheses of glycosyloxysuccinimides and their transformations into glycoprobes. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 6679-6686.
- 116 L.A. Marcaurelle, E.C. Rodriguez, C.R. Bertozzi. Synthesis of an oxime-linked neoglycopeptide with glycosylation-dependant activity similar to its native counterpart. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 8417-8420.
- 117 O. Renaudet, P. Dumy. Chemoselective template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrate. *Org. Lett.*, **2003**, 243-246.
- 118 O. Renaudet, P. Dumy. Synthesis of multitopic neoglycopeptides displaying recognition and detection motifs. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 3619-3622.
- 119 L.A. Marcaurelle, Y. Shin, S. Goon, C.R. Bertozzi. Synthesis of oxime-linked mucin mimics containing the tumor-related Tn and sialyl Tn antigens. *Org. Lett.* **2001**, 3, 3691-94.
- 120 E.C. Rodriguez, L.A. Marcaurelle, C.R. Bertozzi. Aminooxy-, hydrazide-, and thiosemicarbazide-functionalised saccharides : versatile reagents for glycoconjugate synthesis. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 7134-7135.
- 121 E.C. Rodriguez, K.A. Winnans, D.S. King, C.R. Bertozzi. A strategy for the chemoselective synthesis of O-linked glycopeptides with native sugar-peptide linkages. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9905-9906.
- 122 L.A. Marcaurelle, C.R. Bertozzi. Chemoselective elaboration of O-linked glycopeptide mimetics by alkylation of 3-ThioGalNAc. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1587-1595.
- 123 Y. Shin, A. Winans, B.J. Backes, S.B.H. Kent, J.A. Ellman, C.R. Bertozzi. Fmoc-based synthesis of peptide- $\alpha$ -thioesters : application to the total chemical synthesis of a glycoprotein by native chemical ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 11684-11689.
- 124 M.J. Grogan, M.R. Pratt, L.A. Marcaurelle, C.R. Bertozzi. Homogeneous glycopeptides and glycoproteins for biological investigation. *Annu. Rev. Biochem.*, **2002**, 71, 593-634.
- 125 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. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity*, **1994**, 1, 751-761.
- 126 S.S. Wang. *p*-Alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1333
- 127 L.A. Carpino. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 4397-4398.
- 128 V. Dourtoglou, B. Gross. O-Benzotriazolyl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis*, **1984**, 572-574.
- 129 C. Buré, D. Lelièvre, A. Delmas. Identification of by-products from an orthogonal peptide ligation by oxime bonds using mass spectroscopy and tandem mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, 14, 2158-2164.
- 130 H. Rink. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790

- 
- 131 S.B.H. Kent. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **1988**, 57, 957-989.
- 132 E. Atherton, V. Woolley, R.C. Sheppard. Internal association in solid phase peptide synthesis. Synthesis of cytochrome C residues 66-104 on polyamide supports. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1980**, 970-971.
- 133 a)B. Due Larsen, D.H. Christensen, A. Holm, R. Zillmer, O. Faurskov Nielsen. The Merrifield peptide synthesis studied by near infrared fourier-transform raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 6247-6253.
- b)R. Warrass, J.-M. Wieruszkeski, C. Boutillon, G. Lippens. High-resolution magic angle spinning NMR study of resin-bound polyalanine peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1789-1795.
- 134 a)F.C. Westall, A.B. Robinson. Solvent modification in Merrifield solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 2842-2844
- b)J.C. Hendrix, K.J. Halverson, J.T. Jarett, P.T. Lansbury. A novel solvent system for solid-phase synthesis of protected peptides: the disaggregation of resin-bound antiparallel  $\beta$ -sheet. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4517-4518.
- 135 W.A. Klis, J.M. Stewart. Chaotropic salts improve SPPS coupling reactions. *In Peptides: chemistry, structure and biology; Proceeding of the 11<sup>th</sup> american symposium.* (ed. J. E. Rivier, G.R. Marshall), Escom, Leiden, Netherlands, **1990**, 904.
- 136 J.P. Tam, Y-A Lu. Coupling difficulty associated with interchain clustering and phase transition in solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 12058-12063.
- 137 E. Atherton, D.L.J. Clive, R.C. Sheppard. Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 29, 6584-6585.
- 138 W.S. Hancock, D.J. Prescott, P. Roy Vangelos, G.R. Marshall. Solvation of the polymer matrix. Source of truncated and deletion sequence in solid phase synthesis. *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 774-781.
- 139 M. Meldal. PEGA : a flow stable polyethylene glycol dimethylacrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3077-3080.
- 140 C. Arunan, V.N.R. Pillai. Synthesis of acyl carrier protein fragment 65-74 on a flexible cross-linked polystyrene support : comparison with Merrifield resin. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 3005-3011.
- 141 I.M.K Kumar, V.N.R. Pillai, B. Mathew. An efficient gel-phase synthesis of peptides on a high capacity flexible crosslinked polystyrene support : comparison with Merrifield resin. *J. Peptide Sci.*, **2002**, 8, 183-191.
- 142 E. Bayer. Towards the chemical synthesis of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 113-119.
- 143 T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R.C. Sheppard. A reversible protecting group for the amide bond in peptides. Use in the synthesis of "difficult sequences". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 369-372.

- 144 T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter. Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9218-9227.
- 145 E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.
- 146 P. Alewood, D. Alewood, L. Miranda, S. Love, W. Meutermans, D. Wilson. Rapid *in situ* neutralization protocols for Boc and Fmoc solid-phase chemistries. *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 14-29.
- 147 a) D.L. Nguyen, R. Seyer, A. Heitz, B. Castro. Renin substrates. Part 1. Liquid-phase of the equine sequence with benzotriazolylxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). *J. Chem. Soc.*, **1985**, 1025-1031.
- b) M. Schnölzer, P. Alewood, A. Jones, D. Alewood, S.B.H. Kent. *In situ* neutralization in Boc-chemistry solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1992**, 40, 180-193.
- 148 J. Farrera-Sinfreu, M. Royo, F. Albericio. Undesired removal of the Fmoc group by the free  $\epsilon$ -amino function of a lysine residue. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7813-7815.
- 149 B.W. Bycroft, W.C. Chan, S.R. Chhabra, N.D. Hone. A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptide. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 778-779.
- 150 D. Kadereit, P. Deck, I. Heinemann, H. Waldmann. Acid-labile protecting groups for the synthesis of lipidated peptides. *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 1184-1193.
- 151 G. Hübener, W. Göhring, H.J. Musiol, L. Moroder.  $N^{\epsilon}$ -trifluoroacetylation of *N*-terminal hydroxyamino acids: a new side reaction in peptide synthesis. *Pept. Res.*, **1992**, 5, 287-292.
- 152 E. Atherton, V. Woolley, R.C. Sheppard. Internal association in solid phase peptide synthesis. Synthesis of cytochrome C residues 66-104 on polyamide supports. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 970-971.
- 153 D. Lelièvre, C. Buré, F. Laot, A. Delmas. Synthesis of peptide dialdehyde precursor for stepwise chemoselective ligation via oxime bonds. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 235-238.
- 154 P.M. Pihko. Activation of carbonyl compounds by double hydrogen bonding: An emerging tool in asymmetric catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 2062-2064.
- 155 C.H. Depuy, B.W. Ponder. Levulinic acid as a reagent for the hydrolysis of Oximes and 2,4-Dinitrophenylhydrazones. *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 4629-4631
- 156 E.B. Hershberg. Regeneration of steroid ketones from their semicarbazones with pyruvic acid. *J. Org. Chem.*, **1948**, 13, 542-548.
- 157 H. Shao, M.M. Crnogorac, T. Kong, S.-Y. Chen, J.M. Williams, J.M. Tack, V. Gueriguian, E.N. Cagle, M. Carnevali, D. Tumelty, X. Paliard, L.P. Miranda, J.A. Bradburne, G.G. Kochendoerfer. Site-specific polymer to a CCL-5 (RANTES) analogues by oxime exchange. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1350-1351

- 158 C.J. Fitzmaurice, L.E. Brown, T.L. McInerney, D.C. Jackson. The assembly and immunological properties of non-linear synthetic immunogens containing T-cell and B-cell determinants. *Vaccine*, **1996**, 14, 553-560.
- 159 B.T. Dryberg, M.B.A. Oldstone. Peptides as antigens. Importance of orientation. *J. Exp. Med.*, **1986**, 1344-1349.
- 160 Y.-A. Lu, P. Clavijo, M. Galantino, Z.-Y. Shen, W. Liu, J.P. Tam. Chemically unambiguous peptide immunogen : preparation, orientation and antigenicity of purified peptide conjugated to the multiple antigen peptide system. *Mol. Immunol.*, **1991**, 28, 623-630.
- 161 W. Zeng, D.C. Jackson, J. Murray, K. Rose, L.E. Brown. Totally synthetic lipid-containing polyoxime peptide constructs are potent immunogens. *Vaccine*, **2000**, 18, 1031-1039.
- 162 A. Paquet. Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-980.
- 163 A.P. Kozikovski, J. Lee. A synthetic approach to the cis-fused marine pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-dactomelyne. X-ray structure of a rare organomercurial. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 863-870.
- 164 R.U. Lemieux, R.M. Ratcliffe. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244.
- 165 J. Brodefalk, U. Nilson, J. Kihlberg. An improved synthesis of 3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl bromide : a key component for synthesis of glycopeptides and glycolipids. *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 129-132.
- 166 H. Paulsen, J.P. Hölck. Synthese der glycopeptide O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-3)-O-(2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-serin und L-threonin. *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89-107.
- 167 E. Meinjohanns, M. Meldal. Efficient syntheses of core 1, core 2, core 3, and core 4 building blocks for SPPS of mucin O-Glycopeptides based on the N-Dts-method. A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin I*, **1996**, 985-993.
- 168 G. Zemplén, A. Kunz. Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker. *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705-1711.
- 169 N. Smith, D.H. Rammler, I.H. Goldberg, H.G. Khorana. Specific synthesis of the C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>' interribonucleotide linkage. Syntheses of uridylyl-(3'-5')-uridine and uridylyl-(3'-5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 430-440.
- 170 B. Helferich, X Weis. Zur synthese von glucosiden und von nicht-reduzierenden disacchariden. *Chem. Ber.* **1956**, 2, 314-321.
- 171 a) M. Singh, D. O'Hagan. Advances in vaccine adjuvants. *Nat. Biotech.*, **1999**, 1075-1081.  
b) C. Mesa, L. E. Fernandez. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.*, **2004**, 82, 644-650.
- 172 a) J. Golvano, J.J. Lasarte, P. Sarobe, A. Gullon, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta. Polarity of immunogens : implication for vaccine design. *Eur. J. Immunol.*, **1990**, 20, 2363-2366.

- 
- b) C. Partidos, C. Stanley, M. Steward. The effect of orientation of epitopes on the immunogenicity of chimeric synthetic peptides representing measles virus protein sequences. *Mol. Immunol.*, **1992**, 29, 651-658.
- c) I.M. Fernandez, A. Snijders, B.J. Beanissa-Trouwn, M. Harmsen, H. Snippe, C.A. Kraaijeveld. Influence of epitope polarity and adjuvants on the immunogenicity and efficacy of a synthetic peptide vaccine against Semliki Forest virus. *J. Virol.*, **1993**, 10, 5843-5848.
- d) E.M. Petterson, X. Cheng, Z. Qu, L.M. De, L. Maza. The effect of orientation within a chimeric peptide on the immunogenicity of *chlamydia trachomatis* epitopes. *Mol. Immunol.*, **1996**, 33, 335-339.
- e) I.M. Fernandez, M. Harmsen, B.J. Beanissa-Trouwn, I. Stuij, W. Puyk, R.H. Meloen, H. Snippe, C.A. Kraaijeveld. Epitope polarity and adjuvants influence the fine specificity of the humoral response against Semliki Forest virus specific peptide vaccines. *Vaccine*, **1998**, 16, 1531-1536.
- <sup>173</sup> a) J.A. Tainer, E.D. Getzoff, H. Alexander, R.A. Houghten, A.J. Olson, R.A. Lerner. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature*, **1984**, 312, 127-134
- b) E. Westhof, D. Altschuh, D. Moras, A.C. Bloomer, A. Mondragon, A. Klug, M.H.V. Van Regenmortel. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature*, **1984**, 311, 123-126.
- <sup>174</sup> a) B. Friguet, L. Djavadi-Ohanian, M.E. Goldberg. Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to the denatured antigen. *Mol. Immunol.*, **1984**, 673-677.
- b) Z. Hollander, E. Katchalski-Katzir. Use of monoclonal antibodies to detect conformational alterations in lactate dehydrogenase isoenzyme 5 on heat denaturation and on adsorption to polystyrene plates. *Mol. Immunol.*, **1986**, 927-933.
- <sup>175</sup> a) L. Thévenet, R. Vanderesse, M. Marraud, C. Didierjean, A. Aubry. Pseudopeptide fragments and local structures induced by an  $\alpha$ -aminoxy acid in a dipeptide. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 2361-2364.
- b) R.E. Offord, H.F. Gaertner, T.N.C. Wells, A.E.I. Proudfoot. Synthesis and evaluation of fluorescent chemokine and evaluation of fluorescent chemokines labeled at the amino terminal. *Methods Enzym.*, **1997**, 287, 348-369.
- <sup>176</sup> P. Marceau, C. Buré, A. Delmas. Efficient synthesis of C-terminal modified peptide ketones for chemical ligations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, sous presse.
- <sup>177</sup> C. Buré. Fragmentation dans une source à électrobulisaison de biomolécules de synthèse : peptide thioester, acétal, aldéhyde et oligonucléotides bromés. *Thèse présentée à l'université d'Orléans. Chimie analytique*. 30 Juin **2005**.
- <sup>178</sup> W.P. Jencks. Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 475-481.
- <sup>179</sup> J.M. Sayer, B. Pinsky, A. Shonbrunn, W. Washtien. Mechanism of carbinolamine formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 7998-8009.



---

<sup>180</sup> P. Chenevri r, L. Bourel-Bonnet, D. Roux. Chemical characterization of  $\alpha$ -oxohydrazone ligation on colloids : towards grafting molecular addresses onto biologicals vectors. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16261-16270.