



**HAL**  
open science

## Développement de méthodes combinatoires pour la découverte de ligands à base de cyclopeptides.

Vincent Duléry

► **To cite this version:**

Vincent Duléry. Développement de méthodes combinatoires pour la découverte de ligands à base de cyclopeptides.. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00212692

**HAL Id: tel-00212692**

**<https://theses.hal.science/tel-00212692>**

Submitted on 23 Jan 2008

**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.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

Spécialité : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Présentée par :

**Vincent DULERY**

Soutenue publiquement le 14 décembre 2007

---

**DEVELOPPEMENT DE METHODES COMBINATOIRES  
POUR LA DECOUVERTE DE LIGANDS A BASE DE  
CYCLOPEPTIDES.**

---

Directeur de thèse : Pr. Pascal DUMY

Jury composé de :

Dr. Agnès DELMAS	Rapporteur
Pr. Pascal DUMY	Examineur
Dr. Gilles GUICHARD	Examineur
Dr. Serge PEREZ	Président
Dr. Olivier RENAUDET	Examineur
Pr. J.-L. REYMOND	Rapporteur

Thèse préparée au sein du département de Chimie Moléculaire (DCM – Grenoble)



# Remerciements

Ce travail a été réalisé au département de Chimie Moléculaire (DCM), dans l'équipe d'Ingénierie et Interactions Biomoléculaires (I2BM) dirigée par le Pr. Pascal DUMY, à l'Université Joseph Fourier de Grenoble.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Pascal DUMY, mon directeur de thèse qui m'a accueilli au sein de son équipe et m'a permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions. Je le remercie également pour l'entière liberté qu'il m'a laissé au cours des différents projets réalisés, pour sa grande compétence à encadrer mon travail, et pour ses précieux conseils.

Je souhaite remercier particulièrement le Dr. Olivier RENAUDET qui m'a encadré au quotidien tout au long de ce travail et pour cela je tiens à lui témoigner toute ma gratitude. J'ai eu la chance de bénéficier de ces précieux conseils sur de nombreux domaines durant ma thèse. Il a également vivement participé à mon épanouissement scientifique en me faisant participer à des congrès ainsi qu'en me permettant de réaliser plusieurs publications. Enfin, je le remercie pour sa grande aide lors de la rédaction de ce manuscrit à travers ses corrections judicieuses.

Bien entendu, je souhaite remercier les personnes qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et de composer le jury lors de ma soutenance :

- *Mme Agnès DELMAS, Directeur de Recherche au Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans.*
- *Mr Gilles GUICHARD, Directeur de Recherche au laboratoire d'Immunologie et Chimie Thérapeutiques à Strasbourg.*
- *Mr Jean-Louis REYMOND, Professeur à l'Université de Berne.*
- *Mr Serge PEREZ, Directeur de recherche au Centre d'Etudes et de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) à Grenoble.*

J'adresse tous mes remerciements aux personnes qui ont collaborés à ce travail. Je remercie le Pr. J.-L. REYMOND qui m'a accueilli dans son équipe afin que j'apprenne la technique du « split and mix » et la titration de l'aquocobalamine. Sur ce point je tiens à remercier les membres de son équipe : Viviana FLUXA, Noélie MAILLARD et Peter SOMMERS. Ensuite

je remercie le Pr. C. COCHET pour son accueil dans son équipe au CEA de Grenoble et plus particulièrement je remercie Béatrice LAUDET pour les nombreux tests réalisés sur la CK<sub>2</sub>. Egalement, je tiens à souligner l'excellent travail du Pr. Julian GARCIA qui a réalisés les études RMN des complexes peptides/vitamine B<sub>12</sub> et qui m'a souvent aidés en modélisation tout comme Marie-Louise Dheu-Andries. Je n'oublie pas Marie Wilczewski, qui m'a grandement aidé lors des expériences de SPR. Enfin j'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Didier BOTURYN qui m'a permis de réaliser mon stage de DEA au sein du laboratoire et qui m'a également souvent conseillé.

Bien sûr, je tiens à remercier mes collègues de longues dates, Walid et Nabil, qui ont suivi le même cursus universitaire que moi et qui ont poursuivi en thèse dans le même laboratoire ainsi que tous les autres membres de la salle des étudiants : Stéphanie, Myriam, Amandine, Corinne, Babeth, Sophie, Laurent, Ludivine, Gunnar, Sumana, Pierre, Julien et Matthieu. Je les remercie tous pour la très bonne ambiance qui régnait dans notre « immense » bureau. Je pense également à Martin qui était mon voisin de paillasse et avec qui j'ai bien rigolé. Bien évidemment, je ne peux pas partir sans souligner nos formidables tournois de foot avec notre goal « Juju », notre défenseur intraitable Didier et nos attaquants hors pair Walid, Nabil, Eric et Olivier. Je remercie également tous les membres de l'équipe pour leur gentillesse, leur bonne humeur au quotidien : Nathalie, Muriel, Sabine, Jean-François, Martine, Miguel, Elisabeth, Nicolas, Laurent, Rémi, Pascale, Régine, Véronique. Je leur souhaite à tous bonne continuation et de la réussite dans leur vie.

Merci également à tous mes amis, Seb, Manu, Damien, Sylvain, Benoît, Julien, Aurélien pour les sorties régulières autour d'un verre ou pour les soirées foot. J'ai passé d'excellents moments avec eux et j'espère en passer encore beaucoup d'autres.

Pour finir, je veux dédier ce travail à mes parents, Mireille et Alain, car c'est grâce à eux que j'ai pu faire des études et ainsi en arriver jusqu'ici. Je pense également à ma sœur Magali qui a suivi de près ces trois années sans y comprendre grand-chose mais avec un air toujours intéressé. J'ai une pensée toute particulière et je remercie tendrement Delphine pour son soutien permanent et ses encouragements ainsi que pour le bonheur de vivre avec elle au quotidien. Je souhaite à tous leur témoigner tout mon amour.

---

<b>Avant-propos .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>La chimie combinatoire.....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>1. Introduction :.....</b>	<b>- 19 -</b>
1.1. La recherche de composés biologiquement actifs :.....	- 20 -
1.2 Définition de la synthèse combinatoire :.....	- 21 -
1.3. La cible : élément clé de la méthode envisagée .....	- 23 -
<b>2. Elaboration de la stratégie :.....</b>	<b>- 23 -</b>
2.1 Diversité des briques moléculaires utilisées : .....	- 24 -
2.2 Taille et format de la bibliothèque : .....	- 24 -
2.3 Criblage à haut débit : .....	- 25 -
2.3.1. Criblage sur billes de résine.....	- 26 -
2.3.2. Criblage en solution :.....	- 29 -
<b>3. Synthèses : .....</b>	<b>- 30 -</b>
3.1 Quelques méthodes de synthèse combinatoire :.....	- 31 -
3.2 Synthèse sur support ou en solution :.....	- 32 -
3.3 Produits isolés ou mélanges : .....	- 33 -
3.4 Automatisation : .....	- 36 -
3.5 Analyse des bibliothèques :.....	- 37 -
<b>4. Identification des molécules actives : .....</b>	<b>- 38 -</b>
4.1 La "répartition orthogonale" :.....	- 38 -
4.2 Le "positional scanning" : .....	- 39 -
4.3 Déconvolutions itératives et récursives : .....	- 41 -
4.3.1 Déconvolution itérative : .....	- 41 -
4.3.2 Déconvolution récursive :.....	- 42 -
4.4 Codage de bibliothèque :.....	- 44 -
4.4.1 Principe :.....	- 44 -
4.4.2 Via brin d'ADN : .....	- 45 -
4.4.3 Via brin peptidique : .....	- 45 -
4.4.4 Autres méthodes de codage moléculaires : .....	- 46 -
<b>5. Autres méthodes de chimie combinatoire :.....</b>	<b>- 48 -</b>
5.1 La Chimie Combinatoire Dynamique (CCD) : .....	- 48 -
5.2 La méthode « tethering » :.....	- 53 -
<b>6. Notre Projet de recherche :.....</b>	<b>- 54 -</b>
6.1 Bibliothèques élaborées par assemblage chimiosélectif sur châssis peptidique : .....	- 54 -
6.1.2 Démarche synthétique : .....	- 55 -
6.1.3 Déroulement du travail : .....	- 55 -
6.2 Bibliothèques de peptides cycliques par « split and mix » : .....	- 56 -
6.2.1 Démarche synthétique : .....	- 57 -
6.2.2 Déroulement du travail : .....	- 57 -
<b>Chapitre 1 : Synthèse des synthons .....</b>	<b>- 61 -</b>
<b>1. La ligation oxime : .....</b>	<b>- 61 -</b>

<b>2. La synthèse peptidique :</b>	<b>- 62 -</b>
2.1 Principe :	- 62 -
2.2 Synthèse Peptidique sur Phase Solide :	- 64 -
2.3 Types de support en SPPS :	- 67 -
<b>3. Le châssis peptidique RAFT :</b>	<b>- 70 -</b>
3.1 Travaux antérieurs :	- 70 -
3.2 Travaux du laboratoire :	- 70 -
3.3.1 Vectorisation tumorale :	- 72 -
3.3.2 Vaccins synthétiques :	- 73 -
3.3.3 Modèles de fibres amyloïdes :	- 74 -
3.4 Synthèses du gabarit RAFT :	- 75 -
3.4.1 Synthèse du peptide linéaire :	- 75 -
3.4.2 Cyclisation :	- 76 -
3.4.3 Incorporation des résidus sérine :	- 77 -
3.4.4 Oxydation :	- 77 -
<b>4. Synthèses des ligands peptidiques oxyamines :</b>	<b>- 78 -</b>
4.1 Synthèse de peptides modèles :	- 79 -
4.1.1 Synthèse des peptides et protection de la fonction oxyamine par un groupement Boc :	- 79 -
4.1.2 Protection de la fonction oxyamine par un groupement Ethoxyéthylidène :	- 82 -
4.2 Synthèse des acides aminés :	- 88 -
<b>5. Synthèse des ligands saccharidiques :</b>	<b>- 88 -</b>
5.1 Les couplages glycosidiques :	- 89 -
5.2 Contrôle de la stéréochimie :	- 90 -
5.2.1 Les groupes protecteurs :	- 90 -
5.2.2 La nature du solvant :	- 92 -
5.3 Synthèse des sucres oxyamines :	- 93 -
5.3.1 Synthèse du dérivé $\alpha$ -mannose oxyamine :	- 95 -
5.3.2 Synthèse de l'épitope Tn oxyamine :	- 97 -
5.3.3 Synthèse du dérivé $\beta$ -lactose oxyamine :	- 98 -
5.3.4 Synthèse du dérivé $\alpha$ -fucose oxyamine :	- 99 -
<b>Chapitre 2 : Synthèse combinatoire d'hétéroglycoclusters</b>	<b>- 107 -</b>
<b>1. Les interactions sucres-protéine :</b>	<b>- 107 -</b>
1.1 Les Glyconconjugués :	- 107 -
1.2 Les lectines :	- 108 -
1.2.1 Généralités :	- 108 -
1.2.2 Spécificités et affinités :	- 109 -
1.2.3 Types d'interactions dans le site de reconnaissance :	- 111 -
1.3 La multivalence :	- 112 -
1.3.1 Définition :	- 113 -
1.3.2 Les ligands multivalents :	- 113 -
1.3.3 Mécanisme des interactions multivalentes :	- 115 -
1.3.4 Hétéroglycoclusters :	- 116 -
1.4 Etudes déjà réalisées au laboratoire :	- 117 -

<b>2. Projet :</b> .....	<b>- 118 -</b>
2.1 Démarche proposée :	- 118 -
2.2 Aspects théoriques de notre approche :	- 119 -
<b>3. Mis au point de la méthode d'assemblage :</b> .....	<b>- 122 -</b>
3.1 Mis au point des conditions de la réaction :	- 122 -
3.2 Purification des mélanges :	- 123 -
3.3 Caractérisation des mélanges :	- 124 -
<b>4. Synthèses des bibliothèques d'hétéroglycoclusters :</b> .....	<b>- 125 -</b>
4.1 Bibliothèque constituée uniquement d'oligosaccharides :	- 125 -
4.2 Bibliothèque constituée d'oligosaccharides et d'acides aminés :	- 127 -
4.3 Bibliothèque de vaccins multiépitopiques :	- 130 -
4.4 Identification des différentes molécules :	- 132 -
<b>5. Criblage biologique :</b> .....	<b>- 135 -</b>
5.1 Les tests ELLA :	- 135 -
5.2 La chromatographie frontale d'affinité :	- 136 -
5.3 Les colonnes d'affinités :	- 137 -
5.3.1 Principe :	- 137 -
5.3.2 Criblage de nos bibliothèques :	- 138 -
<b>6. Etude des combinaisons sélectionnées :</b> .....	<b>- 141 -</b>
6.1 Séparation :	- 141 -
6.2 Etude par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) :	- 142 -
6.3 Le procédé BIACORE :	- 143 -
6.4 Etude de l'affinité de nos molécules :	- 145 -
6.4.1 Etude des molécules RAFT(Man) <sub>x</sub> (Lac) <sub>4-x</sub> :	- 146 -
6.4.2 Etude des molécules RAFT(Man) <sub>x</sub> (Tyr) <sub>4-x</sub> :	- 149 -
<b>Chapitre 3. Bibliothèques de peptides cycliques par « split and mix »</b> .....	<b>- 155 -</b>
<b>1. Le concept du « split and mix » :</b> .....	<b>- 155 -</b>
<b>2. Identification des séquences des peptides cycliques par Analyse en Acide Aminé (AAA) :</b> .....	<b>- 157 -</b>
<b>3. Projet :</b> .....	<b>- 161 -</b>
<b>4. Bibliothèque de cyclodécapeptide :</b> .....	<b>- 161 -</b>
4.1 Choix de la résine :	- 161 -
4.2 La cyclisation sur résine :	- 161 -
4.3 Synthèse et analyse de la bibliothèque L1 :	- 163 -
4.3.1 Analyse d'un échantillon de la bibliothèque :	- 165 -
4.3.2 Analyse d'une bille :	- 166 -
4.4 Etude de L1 :	- 167 -
4.4.1 La vitamine B <sub>12</sub> :	- 168 -
4.4.2 Criblage sur l'aquocobalamine :	- 169 -
4.4.3 Resynthèse des séquences actives :	- 170 -
4.4.4 Titration de l'aquocobalamine :	- 171 -

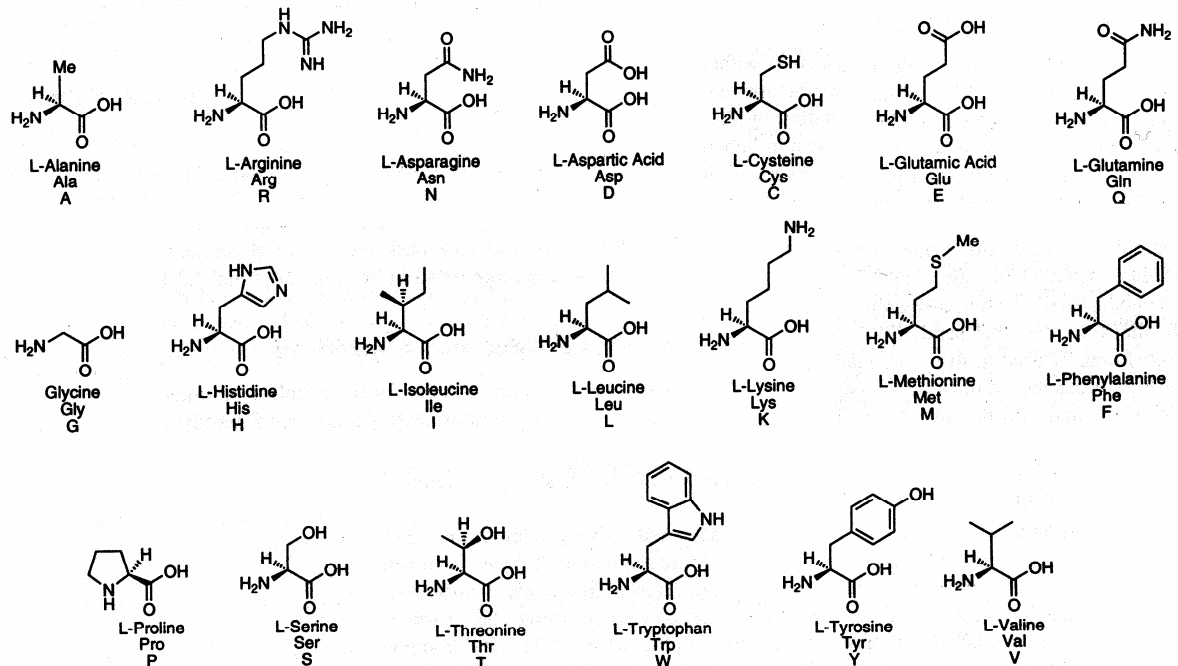


4.4.5 Etudes structurales : .....	- 174 -
4.4.6 Criblage sur la Cyanocobalamine : .....	- 178 -
<b>5. Bibliothèque cyclique de 15 acides aminés : .....</b>	<b>- 178 -</b>
5.1 La Casein Kinase II : .....	- 178 -
5.2 Caractérisation des « hot spots » : .....	- 179 -
5.3 Conception rationnelle d'un inhibiteur peptidique : .....	- 180 -
5.4. Notre projet : découverte de nouveaux ligands par chimie combinatoire.....	- 182 -
5.5 Tests biologiques :.....	- 184 -
<b>Conclusion.....</b>	<b>- 187 -</b>
<b>Partie Expérimentale .....</b>	<b>- 193 -</b>
<b>1. Matériel utilisé :.....</b>	<b>- 193 -</b>
<b>2. Protocole standard pour la synthèse des peptides : .....</b>	<b>- 195 -</b>
<b>3. Synthèses : .....</b>	<b>- 200 -</b>
3.1 Synthèses des peptides : .....	- 200 -
3.2 Synthèses des sucres : .....	- 207 -
3.3 Synthèses des bibliothèques:.....	- 221 -
<b>4. Tests et criblages biologiques :.....</b>	<b>- 231 -</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>- 235 -</b>

# *Abréviations et acronymes*

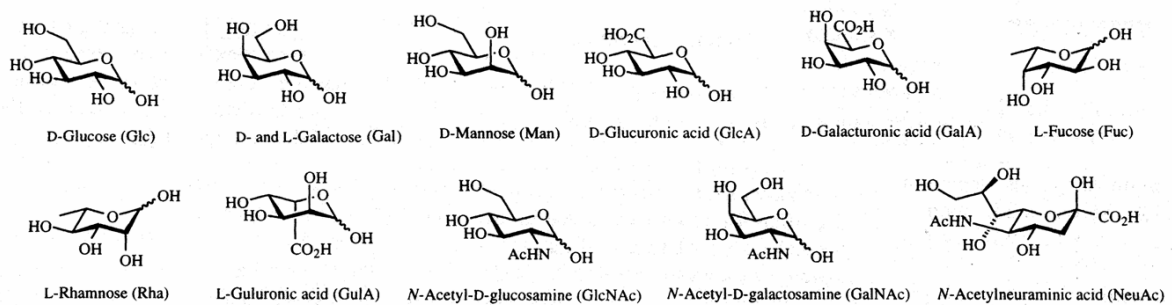
<b>Ac</b>	Acétyle	<b>NOESY</b>	Nuclear overhauser effect spectroscopy
<b>AcOEt</b>	Acétate d'éthyle	<b>OAlI</b>	Ester allylique
<b>AcOH</b>	Acide acétique	<b>PEGA</b>	Résine poly(éthylène glycol)-diméthylacrylamide
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anhydride acétique	<b>PhtOH</b>	N-hydroxyphthalimide
<b>Alloc</b>	Allyloxy-carbonyle	<b>PNA</b>	Peanut Agglutinin
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin	<b>ppm</b>	Partie par million
<b>Boc</b>	Tertiobutyloxy-carbonyle	<b>PTC</b>	Catalyse par transfert de phase
<b>Bn</b>	Benzyle	<b>PyBOP<sup>®</sup></b>	(benzotriazol-1-yl-oxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
<b>BnBr</b>	Bromure de benzyle	<b>RAFT</b>	Regioselectively addressable functionalized template
<b>C<sub>ar.</sub></b>	Carbones aromatiques	<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince	<b>ROESY</b>	Rotating frame noesy
<b>CLHP</b>	Chromatographie liquide haute performance	<b>RX</b>	Rayons X
<b>ConA</b>	Concanavaline A	<b>SASRIN<sup>®</sup></b>	Super acid-sensitive resin
<b>DAST</b>	Trifluorure de diéthylaminosulfure	<b>SM (ESI)</b>	Spectrométrie de masse (ionisation par électrospray)
<b>DCC</b>	N,N-dicyclohexylcarbodiimide	<b>SPPS</b>	Synthèse peptidique sur phase solide
<b>DCM</b>	Dichlorométhane	<b>SPR</b>	Résonance de plasmon de surface
<b>DIEA</b>	N,N-Diisopropyléthylamine	<b>T ou TF</b>	Résidu Gal-β1-3-GalNAc
<b>DMF</b>	N,N-Diméthylformamide	<b>t.a</b>	Température ambiante
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	<b>TASP</b>	Template assembled synthetic protein
<b>ELLA</b>	Enzyme-like lectin assays	<b>tBu</b>	tertiobutyle
<b>éq.</b>	Equivalent molaire	<b>TEA</b>	Triéthylamine
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Ether éthylique	<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>EtOH</b>	Ethanol	<b>TFE</b>	Trifluoroéthanol
<b>Fmoc</b>	9-Fluorénylméthoxycarbonyle	<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>GCOSY</b>	Gradient correlation spectrometry	<b>TIS</b>	Triisopropylsilane
<b>H<sub>ar.</sub></b>	Protons aromatiques	<b>Tn</b>	Résidu GalNAc
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazole	<b>TNBS</b>	Acide trinitrobenzène sulfonique
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de dissociation	<b>TOCSY</b>	Total correlated spectroscopy
<b>KLH</b>	Keyhole limpet hemacyanin	<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de rétention
<b>(m, μ)g</b>	(milli, micro) gramme	<b>λ</b>	Longueur d'onde
<b>(m, μ)L</b>	(milli, micro) litre		
<b>(m, μ)mol</b>	(milli, micro) mole		
<b>(m, μ)M</b>	(milli, micro) molaire		
<b>MeOH</b>	Méthanol		
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimide		
<b>nm</b>	Nanomètre		
<b>NOE</b>	Nuclear overhauser effect		

## Liste des acides aminés<sup>a</sup> :



a) P. Lloyd-Williams, F. Albercio, E. Girlad. 'Chemical Approches to The Synthesis of Peptides and Proteins.' CRC Press LLC eds., Boca Raton, New York, 1997.

## Liste des principaux monosaccharides<sup>b</sup> :



b) H. M. I. Osborn, T. H. Khan. 'Oligosaccharides : Their synthesis and biological roles.' Oxford University Press Inc., New York, 2000.

---

*Avant-propos*

---



## Avant-propos

Quel point commun existe-t-il entre synthèse *Combinatoire*, en *Parallèle* et à *Haut Débit* ? Toutes ces méthodes sont créatrices de diversité moléculaire grâce à la préparation de *Bibliothèques* de composés. La recherche de nouvelles espèces actives est devenue un enjeu primordial dans de nombreux domaines et l'arrivée de ces techniques est en train de remodeler profondément le paysage de la Chimie.

La Chimie Combinatoire a changé de manière significative les processus d'élaboration de nouvelles molécules au niveau de l'industrie pharmaceutique. Elle associe une grande variété de disciplines qui s'étalent de la biologie à l'informatique en passant par la robotique. Généralement, les propriétés vis-à-vis d'une cible biologique sont évaluées, mais d'autres utilisations peuvent être envisagées comme, par exemple, la recherche de nouveaux supraconducteurs ou de catalyseurs<sup>1</sup>.

D'une certaine manière, les chimistes se sont lancés dans la recherche de nouvelles propriétés avec une approche empirique qui semblait au tout début appartenir au monde des Alchimistes. En effet, l'idée de départ est basée sur la constitution de mélanges, d'ensembles ou de bibliothèques de produits. Ce concept fut accueilli dans les années quatre-vingt par une partie de la communauté scientifique comme une idée datant d'un autre âge. La reconnaissance de la synthèse combinatoire a nécessité plusieurs années et un changement de mentalité parmi les chimistes. Certaines des premières velléités de publications en la matière furent confrontées à des remarques relativement cinglantes concernant la pureté des produits mis en jeu. Le début des années quatre-vingt-dix vit l'acceptation du concept mais des restrictions furent faites sur la reproductibilité des expériences en laboratoire. Cet outil fut d'abord utilisé pour la synthèse d'oligomères tels que les peptides, peptoides et oligonucléotides. Plus récemment, l'approche combinatoire a été appliquée à la préparation de petites molécules organiques.

Historiquement, la chimie combinatoire commença dans plusieurs laboratoires en même temps. On peut noter le travail de R. Frank en Allemagne sur la synthèse de nucléotides<sup>2</sup>, ou celui de

---

<sup>1</sup> a) F. Balkenhohl, C. Von Dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel. « Combinatorial Synthesis of Small Organic Molecules. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35 2288-2337; b) B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. Turner., W. H. Weinberg. « Combinatorial Materials Science and Catalysis. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2494-2532.

<sup>2</sup> R. Frank, W. Heikens, G. Heisterberg-Moustis, H. Blöcker. « A New General Approach for the Simultaneous Chemical Synthesis of Large Number of Oligonucleotides : Segmental Solid Supports. » *Nucl. Acid. Res.* **1983**, 11, 4365-4377.

Geysen en Australie qui développa la synthèse de peptides sur support<sup>3</sup>. La préparation de bibliothèques de peptides dans de curieux réacteurs ayant la forme de « tea bags » fut élaborée par Houghten en Californie à peu près à la même époque<sup>4</sup>. Même si la paternité de cette nouvelle approche synthétique reste assez controversée, tout le monde s'accorde sur son origine ; La Nature est bien la mère de la diversité. La création de cette diversité a été engendrée par les mélanges mis en réaction à froid, à chaud, sous pression... pendant des milliards d'années !

La littérature actuelle abonde sur ces techniques récentes d'élaboration de bibliothèques. On peut noter à titre d'exemples plusieurs revues<sup>5</sup>, articles<sup>6</sup>, livres<sup>7</sup> ainsi qu'un périodique<sup>8</sup>, le « Journal of Combinatorial Chemistry » entièrement consacré à la chimie combinatoire a été créé par l'American Chemical Society en janvier 1999. C'est une chimie qui à l'heure actuelle est en plein essor comme le montre l'augmentation spectaculaire du nombre de publications dans ce domaine depuis une dizaine d'année (Fig. 1).

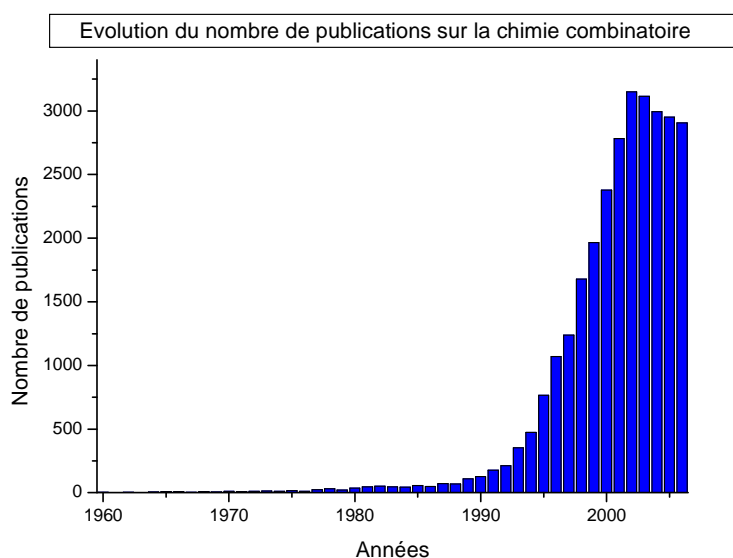


Figure 1 : Développement de la chimie combinatoire au fil des années.

<sup>3</sup> H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling. « Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3998-4002.

<sup>4</sup> R. A. Houghten. « General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 5131-5135.

<sup>5</sup> a) L. A. Thompson, J. A. Ellman. « Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. » *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600; b) JAEllman. « Design, synthesis and evaluations of small molecule libraries. » *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 132-143.

<sup>6</sup> a) R. Baudelle, L. Bourel, R. Poulain, S. Vendeville, A. Tartar. « Premier symposium Français sur la chimie combinatoire. » *L'Actualité Chimique*. **1997**, janvier, 13-19 ; b) M. Smith. « Les chimistes jouent aux billes. » *La Recherche*, **1997**, mai, 48-52.

<sup>7</sup> a) D. Obrecht, J. M. Villalgordo. « Solid-supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries. » *Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 17* ; b) Series Editors : J. E. Baldwin, William FRS and R. M.; Pergamon ; Elsevier Science **1998**.

<sup>8</sup> Editor : W. A. Czarnik. *Journal of Combinatorial Chemistry*. **1999**, 1. Registered in U. S. Patent and Trademark Office ; Copyright 1999 by the American Chemical Society.

L'existence de ces techniques récentes prend racine dans la nécessité de fabriquer un maximum de composés différents en un minimum de temps. En effet, les nouvelles substances doivent être mises sur le marché très rapidement car la concurrence est très présente dans l'industrie chimique et pharmaceutique et une énorme pression est appliquée sur la recherche et le développement. De ce fait, il est devenu nécessaire de constituer ces bibliothèques rapidement, on parle alors de synthèses à hauts débits.

Néanmoins, à l'heure actuelle, aucun médicament issu de la chimie combinatoire n'a été mis sur le marché. Les premières expériences en chimie combinatoire remontant à 1991, la technique est encore trop « jeune » si l'on considère que le processus complet de découverte d'un nouveau médicament prend en moyenne dix ans. Cependant, le bilan est encourageant. La compagnie américaine Eli Lilly possède un composé issu de la chimie combinatoire en développement clinique avancé, agissant sur le système nerveux central (traitement de la migraine). Plusieurs autres sociétés ont des produits en phase I, découverts par les techniques d'optimisation de tête de série, *via* des banques focalisées. Entre autres, Houghten Pharmaceutical a développé un agent de régulation de la cytokine pour lutter contre le cancer, l'obésité et les diabètes non insulino-dépendants. La société Neurogen a identifié un antagoniste de NPY1, neuropeptide impliqué dans l'obésité, grâce aux techniques de chimie combinatoire intégrées dans le processus classique de chimie médicinale. Le produit est actuellement en développement clinique, la phase pré-clinique n'ayant duré que deux ans et demi.

Mon projet de thèse s'inscrit dans ce contexte. A travers ce manuscrit et ce travail, nous proposons d'explorer de nouvelles techniques combinatoires pour découvrir des molécules biologiquement actives originales à base de peptides cycliques.





---

*La chimie combinatoire*

---



## La chimie combinatoire

### 1. Introduction :

Lors des dernières années, la chimie combinatoire a attiré l'attention des industries pharmaceutiques car elle offre de nouvelles perspectives pour la découverte de molécules actives. Elle fut d'abord appliquée à la préparation de bibliothèques de peptides<sup>9</sup> et d'oligonucléotides<sup>10</sup>, puis fut ensuite élargie aux protéines<sup>11</sup>, oligomères synthétiques<sup>12</sup>, petites molécules<sup>13</sup> et oligosaccharides<sup>14</sup> (Fig. 2). Les méthodes généralement utilisées pour préparer des bibliothèques des composés peuvent être de nature chimique ou biologique.

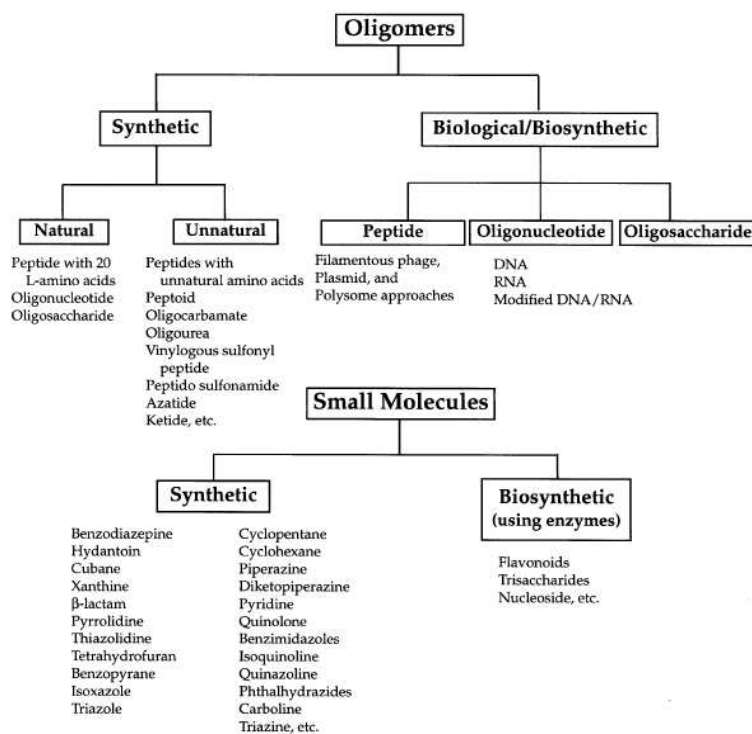


Figure 2 : Différentes applications de la chimie combinatoire et possibilités d'action<sup>15</sup>.

<sup>9</sup> R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, « Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery. » *Nature* **1991**, 354, 84-86.

<sup>10</sup> A. D. Ellington, J. W. Szostak. « *In vitro* Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands. » *Nature* **1990**, 346, 818-822.

<sup>11</sup> C. F. Barbas, J. D. Bain, D. M. Hoekstra, R. A. Lerner. « Semisynthetic Combinatorial Antibody Libraries: A Chemical Solution to the Diversity Problem. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 4457-4461.

<sup>12</sup> C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz. « An Unnatural Biopolymer. » *Science* **1993**, 260, 1303-1305.

<sup>13</sup> L. A. Thompson, J. A. Ellman. « Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. » *Chem. Rev.* **1996**, 96, 555-600.

<sup>14</sup> S. J. Danishefsky, K. F. McCure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri. « A strategy for the Solid-phase Synthesis of Oligosaccharides. » *Science* **1993**, 260, 1307-1309.

<sup>15</sup> K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak. « The One-Bead-One-Compound Combinatorial Library Method. » *Chem. Rev.* **1997**, 97, 411-448.

La chimie combinatoire étant un domaine extrêmement vaste, je vais essentiellement m'attarder sur les principales techniques de synthèse chimiques avec quelques exemples significatifs. Plus particulièrement, je vais centrer cette présentation sur la chimie combinatoire appliquée aux peptides. En effet, grâce aux techniques de synthèse en phase solide développées par Merrifield<sup>16</sup>, qui lui ont d'ailleurs valu le Prix Nobel de Chimie en 1984<sup>17</sup>, la synthèse de collections de peptides peut être considérée comme à la base de ce domaine d'activité. Comme nous le verrons par la suite, de nombreuses méthodes ont été envisagées pour la préparation de ce type de bibliothèques par Chimie Combinatoire. Parmi les stratégies les plus utilisées, celle de type "split and mix" (ou partage et mélange, S&M) occupe une place particulière.

### **1.1. La recherche de composés biologiquement actifs :**

L'identification de molécules actives est généralement effectuée par des tests d'évaluation biologiques qui mettent généralement en jeu des cibles comme des récepteurs ou des enzymes. La mise au point et le développement de méthodes de sélection automatisées permet actuellement de déterminer l'activité d'un grand nombre de composés différents dans un temps relativement faible. Ces techniques, dites de criblage à haut débit, proviennent principalement des progrès de la biologie moléculaire, la robotique et l'informatique. Elles permettent aujourd'hui de tester plusieurs centaines de milliers de produits par semaine vis-à-vis d'une ou plusieurs cibles biologiques simultanément. Face à de telles performances, la chimie organique dite "classique" n'est plus en mesure de fournir assez de composés dans un laps de temps aussi court. Avant l'arrivée de la chimie combinatoire, les produits testés étaient soit issus de la synthèse chimique classique, soit extraits de sources naturelles comme par exemple les plantes ou les animaux (venins de serpents). Cependant ces méthodes se révèlent être aujourd'hui insuffisantes pour la recherche de composés actifs. Les chimistes ont donc proposé récemment une troisième voie qui fait intervenir le concept de Chimie Combinatoire. Il s'agit en fait de synthétiser rapidement un grand nombre de molécules sans les isoler, puis de les tester vis-à-vis d'une ou plusieurs cibles biologiques. Cette approche présente l'avantage de purifier et caractériser seulement les produits actifs. Ce qui représente un gain de temps considérable évalué à 70%.

La synthèse combinatoire peut intervenir à différents niveaux du processus de recherche de nouvelles molécules actives (Fig. 3). Son utilisation conjointe avec des bases de la chimie

---

<sup>16</sup> R. B. Merrifield. « Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. » *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

<sup>17</sup> R. B. Merrifield. « Solid Phase Synthesis (Nobel lecture). » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 799-810.

médicinale (identification d'une cible moléculaire...) peut conduire à la création d'un grand nombre de molécules différentes susceptibles de montrer une activité biologique. Cette diversité moléculaire permet d'explorer et éventuellement d'identifier une famille de composés actifs appelée tête de série.

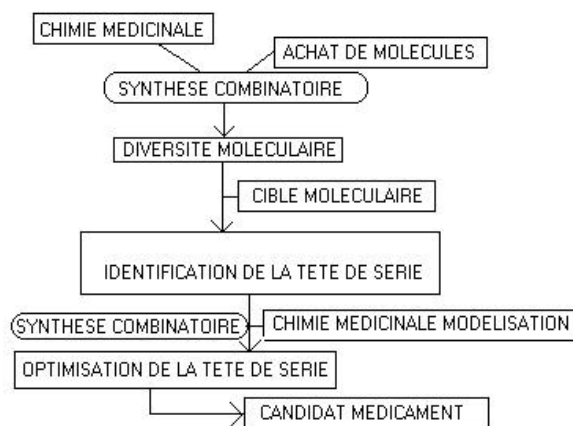


Figure 3 : Rôle de la synthèse organique dans la découverte d'un médicament<sup>1</sup>

Ensuite, afin d'optimiser l'activité de ce groupe de produits, la synthèse combinatoire peut être à nouveau employée en parallèle avec la chimie traditionnelle et la modélisation moléculaire. Après l'optimisation de la tête de série, les composés présentant les meilleurs résultats deviendront des candidats médicaments (Fig. 3). Les potentialités de cette approche sont énormes car elle peut aller puiser dans un vaste réservoir de composés inconnus.

## 1.2 Définition de la synthèse combinatoire :

Traditionnellement, en synthèse organique classique, deux réactifs A et B sont mis en réaction pour donner majoritairement un produit A-B. A l'opposé, en synthèse combinatoire, les réactions mettent en jeu des ensembles de réactifs ; en général, un ensemble de composés de réactivité A ( $A_1...A_n$ ) est combiné avec un ensemble de composés de réactivité B ( $B_1...B_n$ ) (Fig. 4).

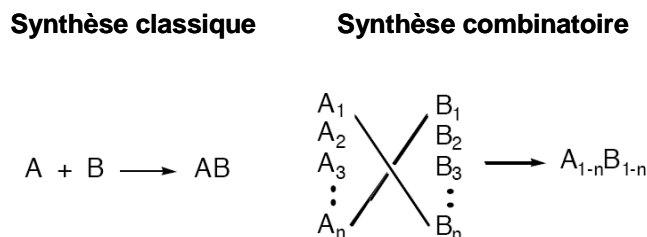


Figure 4 : Comparaison entre chimie conventionnelle et chimie combinatoire

Prenons l'exemple simple de deux ensembles constitués de deux familles possédant chacune 3 éléments, A1, A2 et A3 réagissant avec B1, B2 et B3 pour donner A1B1, A2B1, A3B1, A2B1, A2B2, A2B3, A3B1, A3B2, A3B3 sous forme d'un mélange de  $3 \times 3 = 9$  produits. D'une manière générale, la réaction de  $n$  composés A avec  $n'$  composés B conduira à un mélange  $n \times n'$  composés différents (Fig. 4). Aucune séparation n'est effectuée à ce stade. Le mélange est directement soumis aux tests biologiques. Si l'un d'eux s'avère positif, alors on procédera à l'identification du composé responsable de l'activité biologique. Une telle stratégie entraîne de sévères contraintes au niveau de la synthèse chimique employée. En effet, il faut que la réaction de A avec B conduise à un composé générique A-B avec un bon rendement. Si d'autres produits (sous produits) sont formés, alors la synthèse combinatoire conduira à un mélange inextricable de produits et sous produits rendant impossible tout essai d'identification structurale de l'espèce active. Il faut donc une chimie extrêmement efficace.

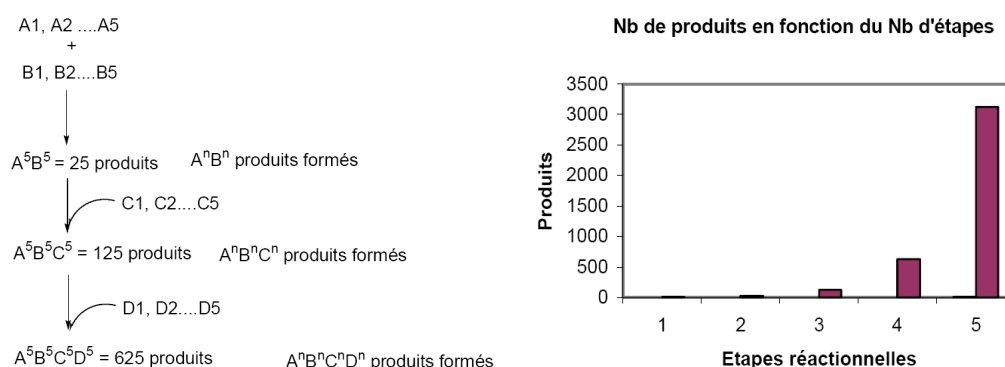


Figure 5 : Synthèse combinatoire multiétapes.

Dans l'exemple décrit ci-dessus, nous avons la formation de produits en une seule étape. Si on étend ce principe de combinaisons aux synthèses multiétapes, ce qui est généralement le cas dans la recherche de composés biologiquement actifs, on obtient un grand nombre de produits pour un faible nombre d'unités réactives. Prenons quatre unités synthétiques différentes An, Bn, Cn et Dn, chacune d'elles est composée de  $n=5$  sous unités présentant des réactivités similaires (Fig. 5). Le graphe représenté sur la figure 5 permet de visualiser le nombre de produits formés en fonction du nombre d'étapes réactionnelles. Dans l'exemple choisi, le nombre de composés préparés (Nb) peut être calculé par la relation  $Nb = 5^m$ , avec  $m$  = nombre d'étapes réactionnelles. L'ensemble des produits possibles préparés lors de la synthèse est appelé bibliothèque, librairie, banque ou collection de composés. Selon la méthode utilisée, une bibliothèque créée peut être constituée de produits différents isolés dans le cas de synthèse en parallèle, ou d'un mélange de composition définie pour la synthèse combinatoire.

### **1.3. La cible : élément clé de la méthode envisagée**

Compte tenu de la richesse des cibles biologiques et du nombre illimité de librairie potentielles réalisables, la description d'une démarche générale reste difficilement réalisable. Nous nous limiterons donc dans cette partie à donner les orientations qui nous semblent essentielles pour élaborer une stratégie combinatoire efficace.

La plupart des méthodes de préparation de bibliothèques impliquent trois étapes : (i) préparation de la bibliothèque, (ii) criblage des composés, (iii) détermination des structures des composés actifs. Avant de débiter la première étape, il est indispensable de prendre en compte un certain nombre de critères. En effet, c'est le choix de la cible va dicter la stratégie, la méthode de synthèse et la de criblage à utiliser.

### **2. Elaboration de la stratégie :**

Lors de l'élaboration d'une stratégie combinatoire, il est tout d'abord nécessaire de considérer la disponibilité et la nature des unités synthétiques (synthons) qui interviendront dans la synthèse de la bibliothèque. En outre, il est nécessaire de pouvoir les obtenir ou les modifier facilement afin de favoriser la diversité moléculaire. Sur le plan chimique, la formation des nouvelles liaisons entre chaque synthon doit conduire à une structure stable dans les conditions de synthèses et lors des tests. De plus, le produit doit être obtenu sélectivement avec de hauts rendements. Enfin, il peut être judicieux d'élaborer des schémas synthétiques nécessitant des conditions opératoires pouvant conduire à une automatisation. Il n'est donc pas étonnant de constater que la synthèse peptidique a été historiquement une des premières applications en chimie combinatoire, ce type de synthèse remplissant pleinement ces conditions.

Trois grandes stratégies d'assemblage peuvent être imaginées<sup>1</sup>. La première fait intervenir des unités réactives bifonctionnelles. Les réactions sont successives, chacune des unités réagit avec une des fonctions de la suivante (Fig. 6A). La deuxième stratégie utilise des composés multifonctionnels. Dans ce cas, les synthons B<sub>n</sub>, C<sub>n</sub>, D<sub>n</sub> et E<sub>n</sub> réagissent avec un dérivé central A<sub>n</sub> (appelé core ou scaffold) présentant plusieurs fonctions différentes (Fig. 6B). La fonctionnalité des unités peut être changée ou modulée lors des réactions mises en jeux. Sur l'exemple de la figure 6C, après réaction de l'unité B<sub>n</sub>, la réactivité de A<sub>n</sub> est modifiée. La réaction avec C<sub>n</sub> conduit alors au produit A<sub>n</sub>B<sub>n</sub>C<sub>n</sub>.



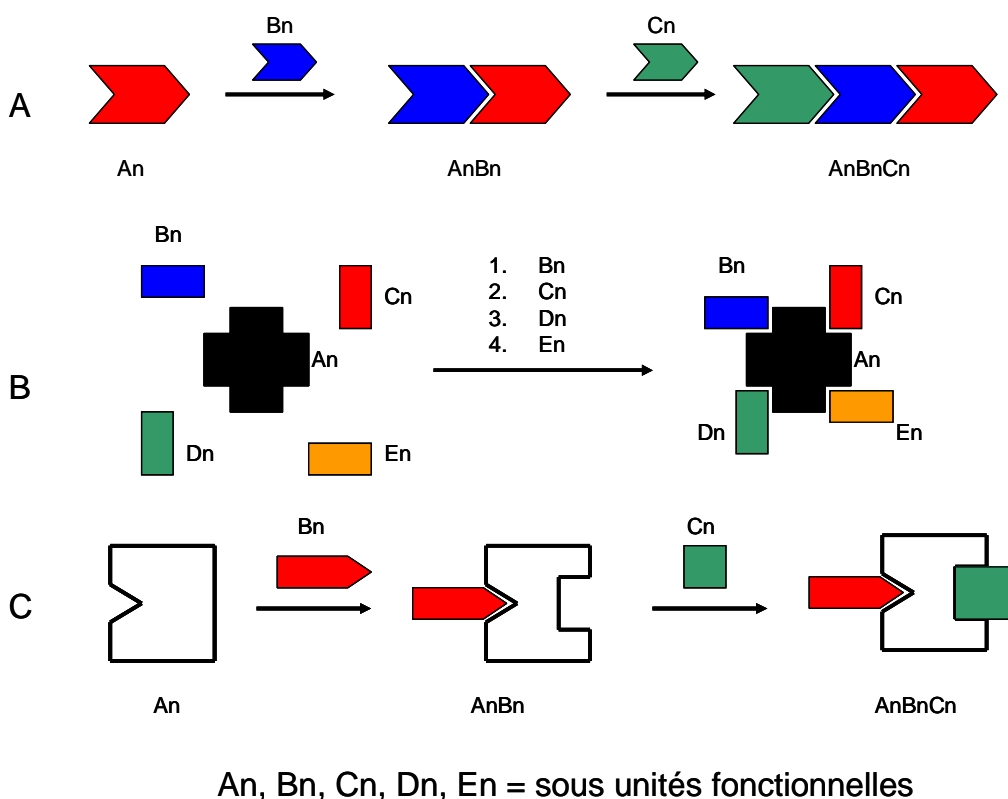


Figure 6 : Modulation de fonctionnalité.

## 2.1 Diversité des briques moléculaires utilisées :

Comme nous l'avons déjà mentionné, le nombre de composés obtenus par voie combinatoire est très grand. De ce fait, il est nécessaire de sélectionner les unités synthétiques les plus adaptées à la synthèse des bibliothèques de produits, lesquels seront susceptibles d'être actifs vis-à-vis de la cible biologique choisie. La chance de trouver un composé actif s'accroît en fonction de la diversité moléculaire créée. Cette diversité peut s'exprimer au travers de bibliothèques plus ou moins importantes constituées de mélanges, mais aussi par la préparation de composés isolés par synthèses en parallèles. Cette dernière technique offre l'avantage de conduire à des produits purs. Cependant, la diversité engendrée est généralement plus faible que dans le cas des mélanges.

## 2.2 Taille et format de la bibliothèque :

En fait, deux cas différents se présentent selon l'objectif recherché :

- Soit il s'agit d'identifier une tête de série. Dans ce cas, il est nécessaire de fabriquer des bibliothèques relativement importantes, (>10 000 composés) pour augmenter la probabilité de découverte d'une molécule active. Si le résultat de l'évaluation est négatif, alors il faut alors chercher des structures issues d'autres bibliothèques. Ces bibliothèques peuvent néanmoins être

conservées et utilisée pour le criblage sur d'autres cibles. Ce processus par élimination permet un gain de temps non négligeable comparé aux méthodes de criblage sur des molécules isolées. Dans le cas où cette librairie se révèle positive, il faudra déterminer le composant actif.

- Soit la tête de série a déjà été identifiée mais une optimisation de la structure est envisagée. Dans ce cas, il est alors préférable de réaliser une recherche par sous-bibliothèques ne dépassant pas 1 000 molécules chacune pour faciliter la déconvolution.

Nous venons de voir qu'une bibliothèque peut être constituée d'un mélange plus ou moins complexe mais également de composés individuels. Le type de test qui sera effectué par la suite va conditionner principalement la sélection d'un format particulier. Par exemple, une répartition en sous-bibliothèques constituées de n produits chacune peut se révéler inadaptée au test considéré, alors que la préparation de composés isolés est envisageable. Si on utilise un mélange, un nombre significatif de composés peut être synthétisé et testé par unité de temps. Cependant, la synthèse devra fournir toutes les structures moléculaires possibles en quantité équivalente dans le mélange. Il faut en effet que toutes les molécules théoriquement attendues soient réellement présentes au sein de la bibliothèque. De faux positifs et/ou négatifs peuvent être également observés dans certains cas, ceci dépend de la synthèse et du système de test qui est utilisé. Cependant ces artefacts peuvent être invalidés lors d'une détermination d'activité effectuée ultérieurement sur les composés isolés ou resynthétisés. Par ailleurs, certaines substances actives peuvent ne pas être détectées au moment de l'évaluation de la bibliothèque en raison de la présence d'autres composés dans le mélange. Cependant, compte tenu du grand nombre de substances testées, on peut se permettre de « manquer » quelques molécules actives pendant le criblage. Si la bibliothèque est trop grande, alors la fiabilité de la détection de composés actifs diminue à cause du bruit de fond. Un compromis doit être trouvé entre la taille de la bibliothèque constituée de mélange (donc de la diversité) d'une part et la fiabilité des tests pratiqués d'autre part.

### **2.3 Criblage à haut débit :**

Le criblage à haut débit (high-throughput screening, HTS) est un procédé dans lequel des lots de produits sont testés vis-à-vis d'une cible biologique<sup>18</sup>. Ces tests permettent de mettre en évidence par exemple, des inhibiteurs d'enzymes, des ligands, des agonistes ou antagonistes

---

<sup>18</sup> A. A. Shelat, R. K. Guy. « The Interdependence Between Screening Methods and Screening Libraries. » *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 244-251.

d'un récepteur donné, des catalyseurs<sup>19</sup>. L'objectif recherché du HTS est d'effectuer rapidement un criblage sur un grand nombre de composés générés en parallèle. Les résultats positifs d'un HTS sont appelés des "hits". Généralement, ces composés sont ensuite rassemblés pour des tests supplémentaires (évaluation plus précise d'une activité inhibitrice, de l'affinité pour un récepteur..). C'est après ce deuxième niveau de triage que les têtes de séries sont déterminées puis resynthétisées.

Le HTS utilise les méthodes et les équipements provenant des applications de la recherche biomédicale et/ou des tests *in vitro*. Les outils de criblage à haut débit sont capables d'évaluer plusieurs dizaines de milliers de molécules ou d'ensembles de composés par mois. Parmi les systèmes simples, on peut citer les tests colorimétriques qui ont été conçus pour révéler l'interaction d'une molécule avec une protéine qui peuvent être réalisés aussi bien en solution que sur support solide. Ces tests ont été standardisés et peuvent être effectués dans des plaques de microtitration à 96 puits qui permettent une lecture robotisée des résultats.

### **2.3.1. Criblage sur billes de résine**

Pour le criblage réalisé sur phase solide, les molécules sont toujours liées au support et le criblage implique : (i) fixation directe de la cible sur la molécule supportée<sup>20</sup> ou (ii) détection via d'autres propriétés des molécules fixées sur le support (réaction enzymatique). S'il y a des composés actifs, les billes correspondantes sont sélectionnées grâce à la couleur ou la fluorescence, récupérée par micromanipulation. La structure est ensuite élucidée par séquençage si c'est un peptide ou par d'autres méthodes. Cet aspect sera développé dans la partie suivante.

Dans ce type de tests le support et le linker doivent être compatible avec les tampons nécessaires pour du test. Les deux supports solides couramment utilisés sont le Polyéthylène glycol greffée sur des billes de polystyrène (Tentagel) et les billes de Polydiméthylacrylamide (PEGA).

- Visualisation directe :

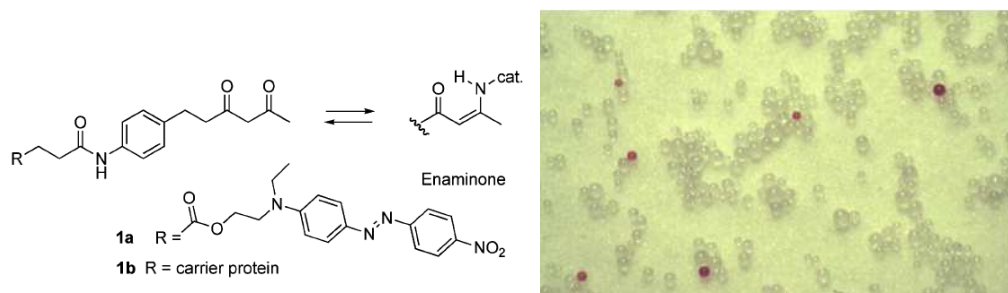
Dans ce genre de criblage, la reconnaissance de la cible envers les molécules fixées sur support peut être détectée par visualisation directe (cible colorée). Par exemple, J.-L. Reymond a

---

<sup>19</sup> J. D. Revell, H. Wennemers. « Peptidic Catalysts Developed by Combinatorial Screening Methods. » *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 269-278.

<sup>20</sup> H. Wennemers, W. C. Still. « Peptide Complexation in Water : Sequence-Selective Binding with Simple Dye Molecules. » *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6413-6416.

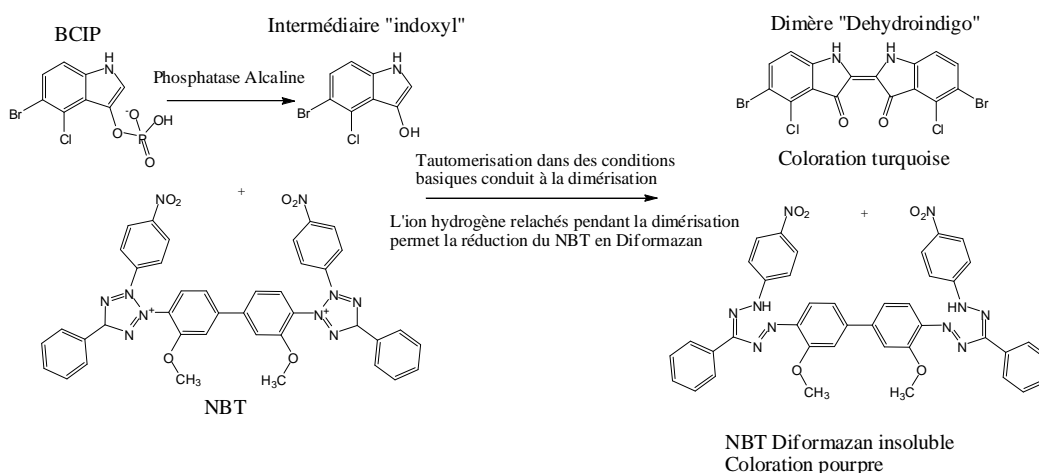
développé une méthode de criblages des bibliothèques de dendrimères peptidiques<sup>21</sup> dans le but de découvrir des peptides ayant une activité catalytique de type aldolase. Ils ont trouvé des séquences permettant la conversion totale du substrat modèle en 3 h à 25°C et avec un excès énantiomérique de 65%. Les substrats utilisés (Fig. 7 - gauche) pour ce criblage permettent de colorer les billes portant les séquences peptidiques positives (ici rouge, Fig. 7 – droite).



**Figure 7 :** Sonde colorée (gauche) permettant un criblage direct sur les billes de résine (droite) (billes rouges sont les billes positives au test).

- Visualisation après réaction enzymatique :

Un autre type de test par détection enzymatique fut décrit en 1991 par Lam<sup>22</sup>. Le criblage d'une bibliothèque de 107 molécules fixées sur des billes a pu être accompli par une personne en une journée. Parmi les systèmes enzymes/substrats utilisables lors de ces criblages on peut citer : Phosphatase alcaline/ 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate (BCIP, permet une coloration turquoise) et tétrazolium nitrobleu (NBT, une fois réduit il devient de couleur pourpre) (Fig. 8), peroxidase/ tétraméthyle de benzidine.



**Figure 8 :** Système Phosphatase Alcaline /BCIP-NBT permettant une coloration des billes.

<sup>21</sup> J. Kofoed, T. Darbre, J. L. Reymond. « Artificial Aldolases from Peptide Dendrimer Combinatorial Libraries. » *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3268-3281.

<sup>22</sup> K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kasimierski, R. J. Knapp. « A new Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-binding Activity. » *Nature* **1991**, *354*, 82-84.

Les reconnaissances non spécifiques de la cible peuvent être un problème non négligeable lors de criblage d'une bibliothèque d'un million de billes. Elles peuvent être éliminées en utilisant des tampons à forte force ionique (0.3-0.4M en NaCl), des détergents non ioniques (Tween 20), ou des protéines (Bovine Serum Albumin). Dans ce but, un test avec une double détection a été développé<sup>23</sup>.

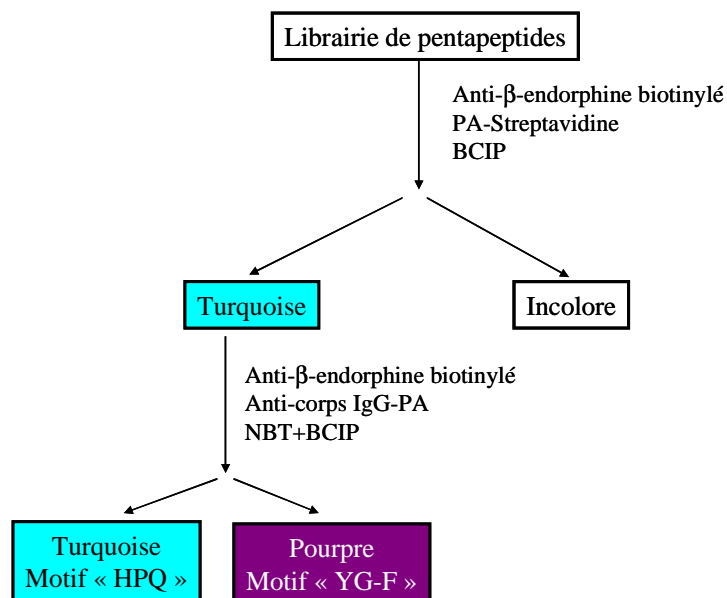


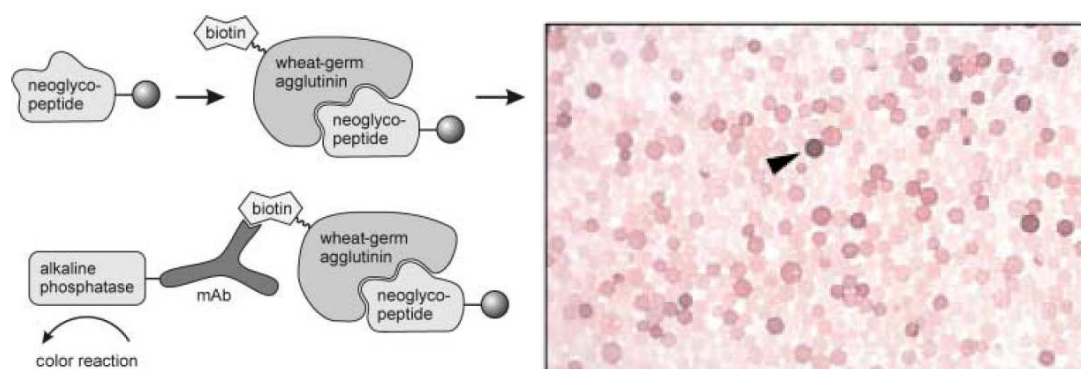
Figure 9 : Méthode de criblage par double détection (PA = Phosphatase Alcaline).

Dans ce travail Lam *et coll.* criblent une bibliothèque de pentapeptide sur l'anticorps anti-β-endorphine (Fig. 9). Tout d'abord, les billes sont mises en présence de l'anticorps anti-β-endorphine biotinylé puis incubé avec une phosphatase alcaline fonctionnalisé par une streptavidine. Après incubation avec le substrat de l'enzyme (BCIP), les billes colorées en turquoise sont isolées. La coloration peut être due à la reconnaissance de l'anticorps, de la streptavidine ou de la phosphatase alcaline sur les peptides, c'est pourquoi un second criblage est réalisé afin d'éliminer les doutes. Les billes colorées sont ensuite lavées avec une solution de guanidine 6M pour interrompre les interactions entre les différents composés. Puis elles sont soumises à un second criblage avec l'anticorps anti-β-endorphine. Après incubation et lavages, ils utilisent un second anticorps anti-IgG de souris fonctionnalisé avec la phosphatase alcaline. Après incubation, le substrat de l'enzyme est rajouté (BCIP+NBT) et un tiers des billes deviennent de couleurs pourpre alors que les autres restent turquoise. Les billes qui sont restées en turquoise sont donc des faux positifs car lors des lavages entre les étapes du

<sup>23</sup> K. S. Lam, S. Wade, F. Abdul-Latif, M. Lebl. « Application of a Dual Color Detection Scheme in the Screening of a Random Combinatorial Peptide Library. » *J. Immunol. Method* **1995**, 180, 219-223.

criblage, l'anticorps anti-IgG fonctionnalisé avec la phosphatase alcaline a été éliminé et n'a pas pu réagir avec les substrats. Ceci prouve que les peptides de ces billes reconnaissent la streptavidine et non pas l'anticorps anti- $\beta$ -endorphine.

Cette méthode de criblage a permis de découvrir des ligands de lectines<sup>24</sup>. Un exemple de criblage par réaction enzymatique réalisé par S. Seeberger a permis de découvrir des néoglycopeptides multivalents reconnaissant la lectine WGA<sup>25</sup>. Le principe du test repose sur la reconnaissance de la WGA biotinylé pour les billes contenant les glycopeptides actifs (Fig. 10, gauche). Puis un anticorps anti-biotine et couplé à la phosphatase alcaline est ajouté. Après ajout du substrat de l'enzyme, les billes actives deviennent rouges grâce à la libération d'un marqueur insoluble rouge qui se colle à la surface des billes (Fig. 10, droite).



**Figure 10** : Principe du test par réaction avec la phosphatase alcaline (gauche) et coloration des billes actives (droite).

### 2.3.2. Criblage en solution :

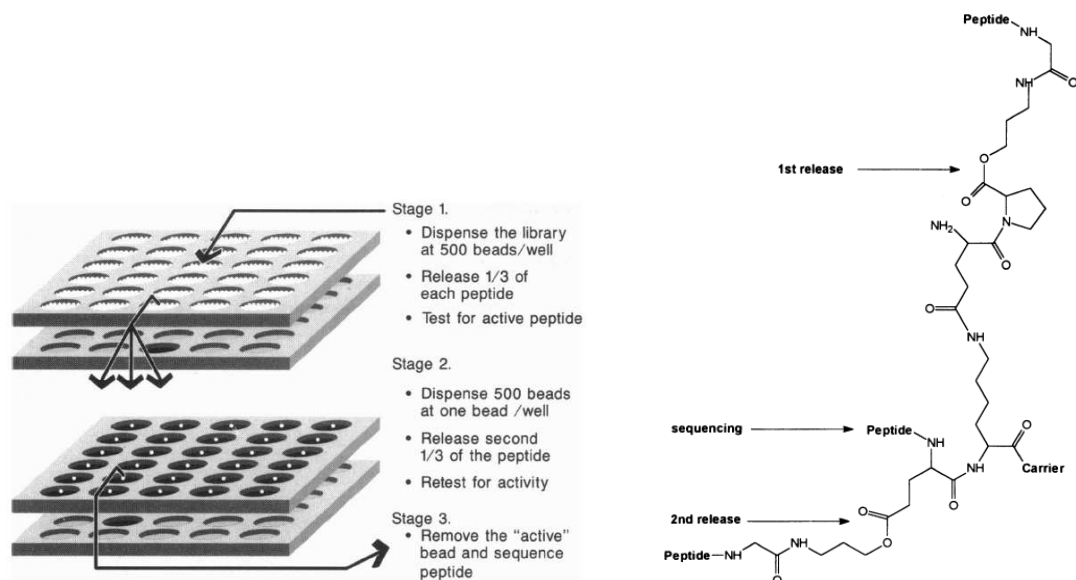
Plusieurs tests sont réalisables selon le principe de compétition entre les molécules et d'autres ligands marqués, comme divers tests enzymatiques. Deux méthodes de criblage en solution ont été développées : (i) sur plaque 96 puits et (ii) libération in-situ des molécules attachées sur les billes de résine. Dans les deux approches, les molécules sont attachées au support via des « linker » éliminables puis sont libérées de chaque bille dans une solution où le test biologique aura lieu. Par exemple, des travaux de Lam<sup>26</sup> décrivent l'incorporation de deux « linkers » clivables orthogonalement lors de la synthèse des bibliothèques (Fig. 11 – droite). Le peptide

<sup>24</sup> L. Ying, R. Liu, J. Zhang, K. Lam, C. B. Lebrilla, J. Gervay-Hague. « A Topologically Segregated One-Bead-One-Compound Combinatorial Glycopeptide Library for Identification of Lectin Ligands. » *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 372-384.

<sup>25</sup> V. Wittmann, S. Seeberger. « Spatial Screening of Cyclic Neoglycopeptides: Identification of Polyvalent Wheat-Germ Agglutinin Ligands. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 900-903.

<sup>26</sup> S. E. Salmon, K. S. Lam, M. Lebl, A. Kandola, P. S. Khattri, S. Wade, M. Patek, P. Kocis, V. Krchnak, D. Thorpe, S. Felder. « Discovery of Biologically Active Peptides in Random Libraries: Solution-Phase Testing After Staged Orthogonal Release from Resin Beads. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 11708-11712.

sera présent en trois exemplaires sur chaque bille de résine. Ils ont ainsi utilisés une plaque de 96 puits filtrables dans chacun desquels ont été introduits entre 100 et 500 billes de résine (Fig. 11 – gauche).



**Figure 11 :** Technique de criblage sur plaques 96 puits filtrables (gauche) et structure des linkers éliminables orthogonalement (droite).

La neutralisation de la solution contenant les billes induit la formation d'une dikétopiperazine entraînant la libération d'un premier peptide. Après une nuit d'incubation, la plaque est filtrée et les filtrats collectés dans une nouvelle plaque où les composés sont testés pour leur activité biologique. Les billes ayant donné une réponse positive sont alors redistribuées dans une plaque filtrable pour une nouvelle série de test, avec une bille par puits. Cette fois-ci, la libération du peptide en solution se fait par traitement alcalin, à l'aide de vapeurs d'ammoniaque. Enfin, le troisième peptide ayant donné une réponse positive au second test est utilisé pour le séquençage.

### 3. Synthèses :

La synthèse de bibliothèques peut être accomplie en parallèle sur support solide ou en solution. Dans ce cas, chaque composé est préparé séparément dans un seul réacteur. Cette méthode est souvent confondue avec la synthèse combinatoire et la terminologie est parfois encore sujette à discussion<sup>27</sup>. Le terme "combinatoire" est utilisé pour la synthèse de bibliothèques constituées de mélanges mais on admet également souvent sous cette dénomination, la préparation de bibliothèques de produits individuels isolés. Il convient de noter que la fabrication de substances

<sup>27</sup> M. Lebl. « Parallel Personal Comments on Classical Papers in Combinatorial Chemistry. » *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 3-24.

par voie combinatoire nécessite l'intervention d'une combinaison de réactifs dans une des étapes de la synthèse, ce qui n'est pas réalisé en synthèse en parallèle. Autrement dit, une étape réactionnelle peut être considérée comme combinatoire à partir du moment où le nombre de compartiments réactionnels est plus petit que le nombre de produits préparés.

### 3.1 Quelques méthodes de synthèse combinatoire :

Il existe cinq grandes méthodes biologiques ou chimiques combinatoires pour élaborer des bibliothèques de produits :

- méthodes *biologiques* telles que le phage display<sup>28</sup> : elle permet d'exprimer des peptides à la surface de bactériophages et de cribler les banques de molécules ainsi constituées aisément et rapidement.
- méthodes d'*adressage spatialement contrôlé*<sup>29</sup> telles que le système multipin<sup>30</sup> ou synthèse « SPOT » sur papier de cellulose<sup>31</sup> : la technique de synthèse de peptides sur épingles dites « multipin » a été décrite par Geysen *et coll.*<sup>30</sup> Elle permet d'attacher des peptides en élévation sur des épingles solides comportant des espaceurs polyéthylène. Lors des couplages, ces épingles sont plongées dans le trou d'une plaque multipuits où se trouvent les réactifs de couplage et l'acide aminé (Fig. 12). Lors des déprotections, l'ensemble de la surface est plongé dans un bain contenant la solution de déprotection. Cette méthode permet ainsi de produire différentes séquences peptidiques en parallèle en plaçant les réactifs différents dans chacun des puits de la plaque. Chaque épingle portera un seul type de séquence peptidique.

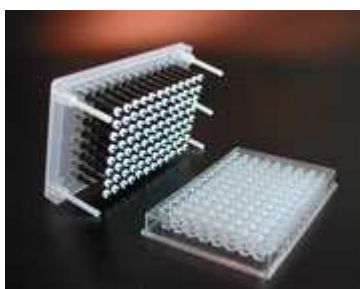


Figure 12 : Appareillage nécessaire à la synthèse « multipin ».

<sup>28</sup> G. P. Smith, V. A. Petrenko. « Phage Display. » *Chem. Rev.* **1997**, 97, 391-410.

<sup>29</sup> M. C. Pirrung. « Spatially Addressable Combinatorial Chemistry. » *Chem. Rev.* **1997**, 97, 473-488.

<sup>30</sup> H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling. « Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid. » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 3998-4002.

<sup>31</sup> R. Frank. « Spot-synthesis: an Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support. » *Tetrahedron* **1992**, 48, 9217-9232.



La synthèse sur papier de cellulose développée par R. Frank<sup>31</sup> permet d'accrocher sur des endroits précis (SPOT) du papier les acides aminés. Pour cela, il est nécessaire d'activer la surface du papier pour réaliser localement la synthèse de différents peptides en déposant les réactifs à l'aide d'une pipette (Fig. 13). Ensuite, le criblage des peptides peut avoir lieu directement sur la surface.

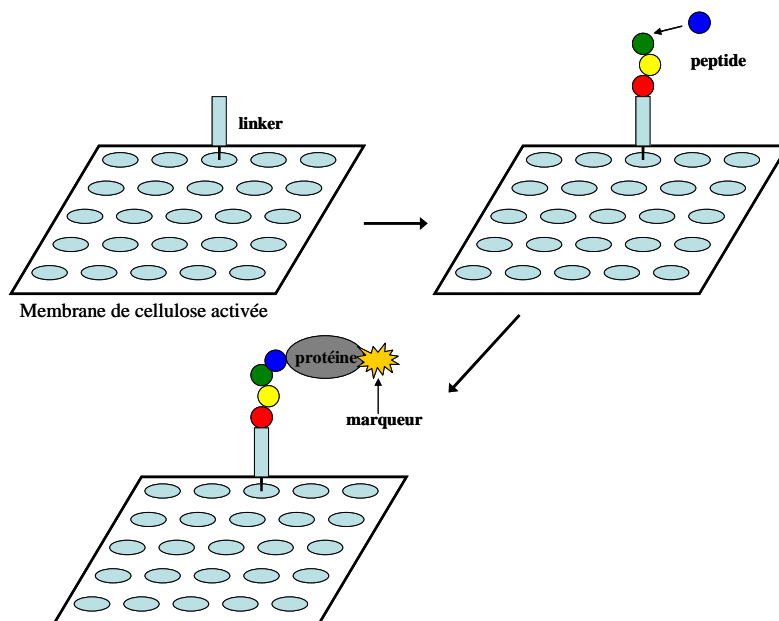


Figure 13 : Principe de la technique de synthèse sur papier de cellulose.

- méthodes qui nécessitent des *déconvolutions* (itératives, récursives) et la synthèse de sous-bibliothèques.
- méthode de type « *split and mix* ».
- méthodes de *synthèse en solution* qui nécessitent généralement des criblages par colonne d'affinité<sup>32</sup>.

Nous reviendrons sur ces trois dernières méthodes dans la suite de ce manuscrit.

### 3.2 Synthèse sur support ou en solution :

On peut distinguer deux grands types de synthèse : synthèse en solution ou sur support solide. De nombreux avantages et inconvénients, qu'il est primordial de comparer lors de la mise en place d'une stratégie synthétique, leur sont associés. Dans les deux cas, les réactifs utilisés doivent posséder des réactivités comparables.

<sup>32</sup> Z. Songyang, B. Margolis, M. Chaudhuri, S. E. Shoelson, L. C. Cantley. « The Phosphotyrosine Interaction Domain of SHC Recognizes Tyrosine-phosphorylated NPXY Motif. » *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14863-14866.

- *Synthèse en solution* : la synthèse en phase liquide présente des avantages non négligeables comme par exemple : i) elle ne requiert pas de réaction supplémentaire de greffage et clivage du support ; ii) les conditions des réactions classiques ne doivent pas être adaptées à la phase solide ; iii) le passage à des quantités plus importantes est plus facile à mettre en place que dans le cas de la phase solide ; iv) il est possible d'isoler et caractériser les produits après chaque étape. Par contre, elle présente des inconvénients qui ne lui permettent pas de surpasser les méthodes de synthèse sur support : i) la synthèse combinatoire en solution nécessite une purification à chaque étape qui peut s'avérer fastidieuse ; ii) emploi de réactifs de réactivités comparables ; iii) l'utilisation d'excès de réactifs nécessite des traitements à chaque étape ; iii) automatisation fastidieuse.

- *Synthèse sur support* : considérant les inconvénients de la synthèse de bibliothèque en solution la phase solide présente beaucoup d'avantages : i) les traitements fastidieux mentionnés précédemment sont remplacés par de simples lavages en phase supportée (élimination des excès de réactifs) ; ii) la réaction peut être complète, voire accélérée grâce à l'utilisation d'un excès de réactif ; iii) les procédures faisant intervenir la phase solide sont plus facilement automatisées. Néanmoins, elle présente également des inconvénients à ne pas négliger : i) elle nécessite une réaction de greffage et de clivage ; ii) le suivi analytique difficile et fastidieux ; iii) certains types de synthèses ne peuvent pas être adaptés sur phase solide ; iv) la purification peut seulement être réalisée en fin de synthèse, les éventuels produits secondaires non pouvant pas être éliminés avant.

L'utilisation de support solide pour la synthèse de bibliothèques est dépendant de trois facteurs interdépendants l'un de l'autre : i) un polymère insoluble et inerte dans les conditions de la synthèse ; ii) choix d'un « linker » qui permet de libérer le produit du support pour l'analyse ou pour continuer la réaction en solution ; iii) une stratégie de groupes protecteurs orthogonaux qui permet de moduler la synthèse.

### **3.3 Produits isolés ou mélanges<sup>33</sup> :**

Lorsque les substances préparées sont isolées, l'ensemble de molécules est fabriqué individuellement en parallèle. Cela signifie que n produits sont fabriqués dans n réacteurs différents. Il faut noter la simplicité et l'automatisation facilement adaptable dans ce cas. Ce

---

<sup>33</sup> R. A. Houghten, C. Pinilla, J. R. Appel, S. E. Blondelle, C. T. Dooley, J. Eichler, A. Nefzi, J. M. Ostresh. « Mixtures-based synthetic combinatorial chemistry. » *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3743-3778.

type de synthèse, bien que limité par le nombre de compartiments peut être aisément adapté à la préparation rapide à haut débit (Fig. 14, gauche). Il convient de souligner à ce niveau, que la synthèse dite en parallèle peut également être employée pour la préparation de mélanges.

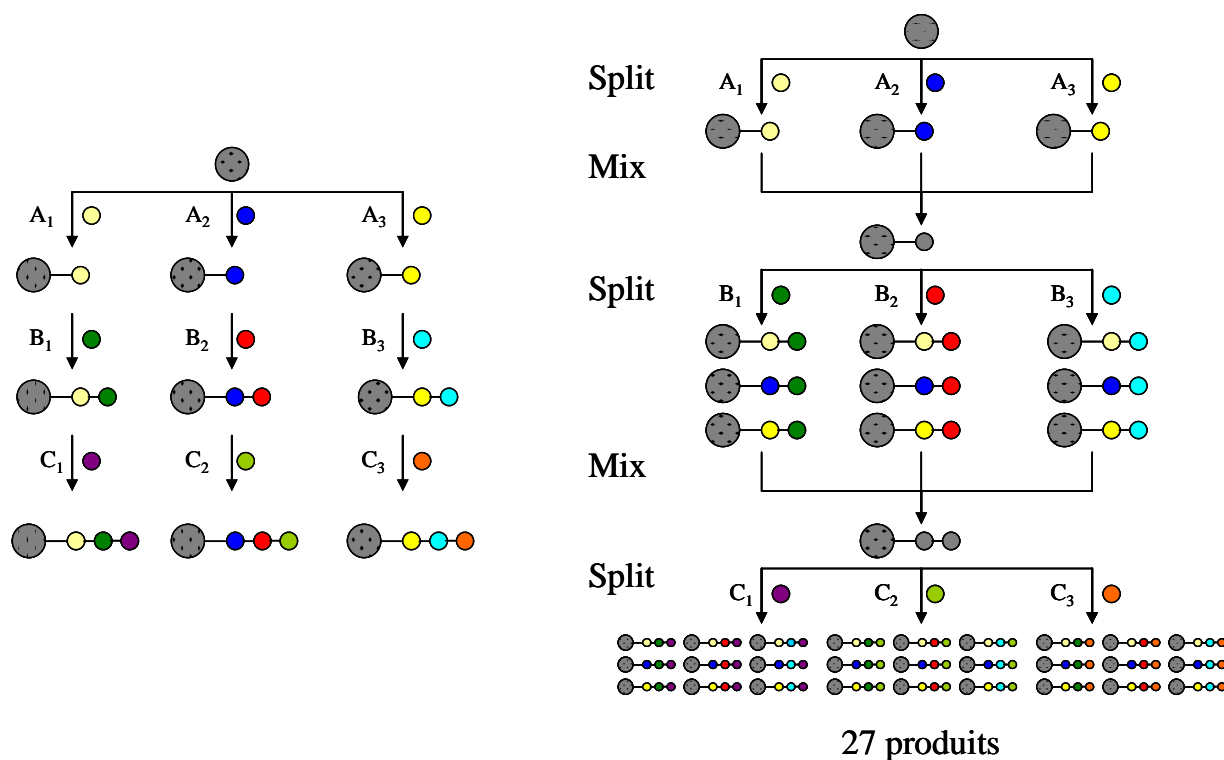
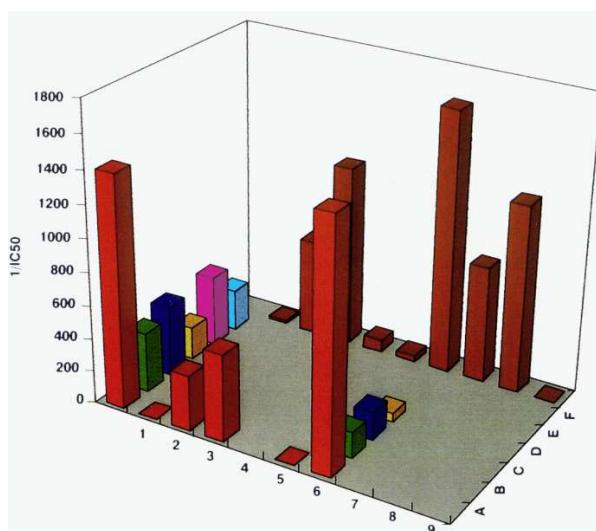


Figure 14 : Synthèse en mode parallèle (gauche) ou split and mix (droite).

La synthèse de mélanges de compositions définies requiert des procédures qui délivrent un grand nombre de composés de structures connues en quantité équimoléculaire. Un mélange de composés doit être utilisé dans chaque étape de manière à ce qu'ils réagissent dans un seul réacteur au même moment. En pratique, il peut s'avérer difficile de former tous les produits en quantité égale. Certains réactifs réagissent moins bien que d'autres, donc les produits issus de ces réactions sont peu ou pas formés. En fait, la disparité d'un mélange n'est pas observée lorsque les synthons présentent des réactivités similaires. Pour éviter le problème de la différence de réactivité et/ou de cinétique, la méthode partage/mélange (Split-mix) a été développée<sup>15</sup>. Dans cette technique, avant chaque étape combinatoire de couplage, les billes de polymères sont divisées en autant de lots que de réactifs introduits au cours de l'étape. Chaque lot est mis en réaction individuellement permettant d'employer un large excès de réactif. En fin de réaction, on re-mélange les billes de résine avant de les diviser à nouveau en lots pour l'étape suivante. En fin de synthèse, chaque bille aura suivi un chemin unique et portera à sa

surface une seule espèce moléculaire contrairement à une synthèse incorporant un mélange de réactifs à chaque étape. Cette dernière génère des billes portant à leur surface un mélange des différents composés possibles (Fig. 14, droite). Cette technique sera développée plus en détails au cours du chapitre 3.

Malgré l'essor de la synthèse sur support, quelques exemples décrivent la synthèse et le criblage de bibliothèque en solution sous forme de mélanges. Plusieurs groupes ont synthétisés des composés dimériques en utilisant des liens amide, ester ou carbamate. Dans l'exemple rapporté par Tiller<sup>34</sup>, quarante chlorures d'acide sont mis en réaction avec quarante amines ou alcools pour donner des amides ou esters. Dans le premier lot, chaque chlorure d'acide (A) est mis en réaction avec une quantité stoechiométrique d'un mélange équimolaire de quarante nucléophiles (N<sub>1-40</sub>).



**Figure 15** : Représentation de l'activité des carbamates présents dans chaque mélange.

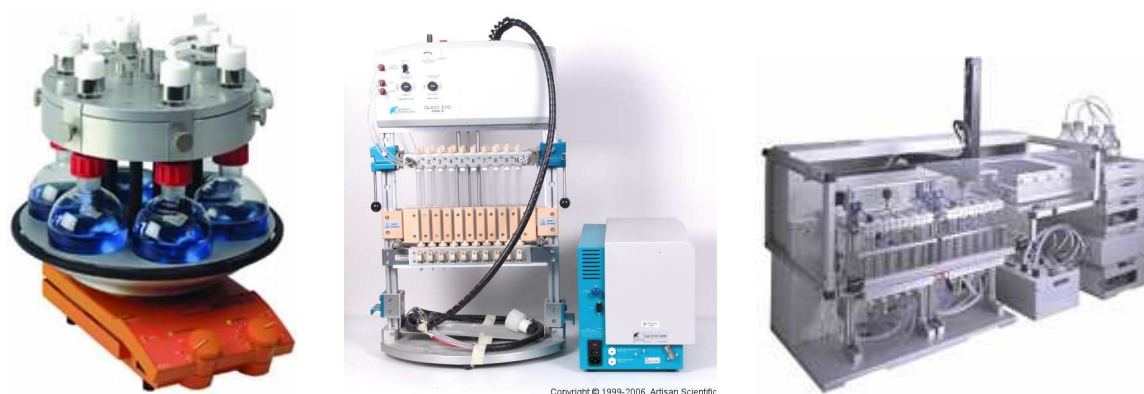
Dans le second, chaque amine ou alcool (N) réagit avec un mélange équimolaire de chlorures d'acide (A<sub>1-40</sub>). Les 80 mélanges de 40 composés sont criblés sur une variété de cibles pharmaceutiques. Des faibles hits ont notamment été découverts sur le récepteur à neurokin-3 (60µM) et sur une metalloprotéinase (2.55µM).

<sup>34</sup> P. W. Smith, J. Y. Q. Lai, A. R. Whittington, B. Cox, J. G. Houston, C. H. Styli, M. N. Banks, P. R. Tiller. « Synthesis and Biological Evaluation of a Library Containing Potentially 1600 Amides / Esters. A Strategy for Rapid Compound Generation and Screening. » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2821-2824.

Pirrung<sup>35</sup> *et coll.* ont utilisés une approche identique pour la synthèse en solution de 54 carbamates à partir de 9 alcools et 6 isocyanates. Une bibliothèque fut construite à partir de chaque alcool avec un mélange équimolaire d'isocyanates et la seconde bibliothèque à partir de chaque isocyanate et d'un mélange équimolaire d'alcools. Les mélanges furent testés sur l'acétylcholinestérase et les résultats sont représentés par une matrice à deux dimensions reflétant les activités des carbamates de la bibliothèque (Fig. 15). On voit par exemple que la combinaison alcool 6 / isocyanate A donne un composé 6A présentant un IC<sub>50</sub> de 0.7 mM.

### 3.4 Automatisation :

Avec la mise au point du concept de bibliothèque de mélanges de molécules est venu le besoin d'automatiser les manipulations afin d'augmenter la productivité. Divers appareillages permettant des synthèses parallèles ou combinatoires sont donnés dans la figure 16.



**Figure 16 :** Appareillage permettant l'agitation de plusieurs réacteurs en synthèse parallèle (gauche, Greenhouse), appareillage permettant de faire plusieurs synthèse peptidique sur phase solide en parallèle (milieu, Argonaut Quest 210), synthétiseur automatisé permettant l'addition des réactifs manuellement ou avec un bras automatisé. Prélèvement d'échantillons et piégeage automatisés. Lavages programmables (droite, SURVEYOR).

Plusieurs synthétiseurs automatiques ont vu le jour, permettant par exemple d'effectuer la méthode split and mix à l'aide d'un mélangeur/répartiteur de résine, ainsi que d'un bras articulé capable d'aller prélever des synthons par reconnaissance de flacons à l'aide de codes barre. Mais, les tendances les plus récentes veulent que les bibliothèques de mélanges fassent place à des bibliothèques individuelles. Leur principe est la synthèse d'un seul produit par réaction, mais de manière automatisée sur des plaques contenant 96 puits le plus souvent. Avec ces formats de bibliothèques, l'automatisation de la caractérisation des produits formés s'est fortement développée.

---

<sup>35</sup> M. C. Pirrung, J. Chen. « Preparation and Screening against Acetylcholinestérase of a Non-Peptide "Indexed" Combinatorial Library. » *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1240-1245.

### 3.5 Analyse des bibliothèques :

Il est essentiel de pouvoir vérifier la présence des produits formés au sein des collections qui sont confectionnées<sup>36</sup>. La technique employée pour la caractérisation de ces ensembles dépend de la taille et du type de la bibliothèque réalisée. Lorsque des substances sont préparées individuellement en synthèse parallèle, l'analyse est identique à celle utilisée pour les produits issus des procédés conventionnels. Dans le cas où cette synthèse est réalisée sur support solide, alors une utilisation des méthodes spectrochimiques comme la spectrométrie de masse (SM)<sup>37</sup>, l'infrarouge (IR)<sup>38</sup>, la résonance magnétique nucléaire (RMN)<sup>39</sup> ou la chromatographie liquide haute performance (CLHP)<sup>40</sup> est possible.

Si les bibliothèques se présentent sous la forme de mélanges, après clivage du support (phase solide), une caractérisation fiable peut s'avérer fastidieuse. Cependant, la spectrométrie de masse peut être employée pour la caractérisation de composés issus de la synthèse de peptides par exemple. Lorsque les mélanges contiennent un nombre relativement restreint de composés, alors l'utilisation d'une technique couplée peut être envisagée. Le couplage en tandem de la CLHP avec la SM peut conduire à une caractérisation des produits du mélange. La chromatographie sépare les différents composés, la masse permet la détermination de la structure des molécules triées (LC/MS). Puisque la SM est déjà employée pour la caractérisation de mélanges biologiques, cette technique se révèle être un outil de choix pour la caractérisation des produits en chimie combinatoire.

Grâce à l'automatisation des synthèses, il est possible d'avoir accès de manière automatique à une caractérisation par la technique LC/MS, après décrochage des produits de leur support,

<sup>36</sup> a) M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon. « Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries. » *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233-1251; b) E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gallop. « Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions. » *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385-1401.

<sup>37</sup> C. L. Brummel, J. C. Vickerman, S. A. Carr, M. E. Hemling, G. D. Roberts, W. Johnson, D. Gaittanopoulos, S. J. Benkovic, N. Winograd. « Evaluation of Mass Spectrometric Methods Applicable to the Direct Analysis of Non-Peptide Bead-Bound Combinatorial Libraries. » *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 237-242.

<sup>38</sup> a) B. Yan, J. B. Fell, G. Kumaravel. « Progression of Organic Reactions on Resin Supports Monitored by Single Bead FTIR Microspectroscopy. » *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7467-7472; b) T. Y. Chan, R. Chen, M. J. Sofia, B. C. Smith. « High throughput on-bead monitoring of solid phase reactions by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS). » *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2821-2824.

<sup>39</sup> a) W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, P. A. Keifer. « High-Resolution <sup>1</sup>H NMR in Solid-Phase Organic Synthesis. » *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955-7956; b) R. C. Anderson, J. P. Stokes, M. J. Shapiro. « Structure Determination in Combinatorial Chemistry: Utilization of Magic Angle Spinning HMQC and TOCSY NMR spectra in the Structure Determination of Wang-bound lysine. » *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311-5314; c) R. C. Anderson, M. A. Jamera, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. Zilioz. « Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry: MAS CH Correlation in Solvent-Swollen Resin. » *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650-2651.

<sup>40</sup> W. L. Fitch, A. K. Szardenings, E. M. Fujinari. « Chemiluminescent Nitrogen Detection for HPLC: An Important New Tool in Organic Analytical Chemistry. » *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1689-1692.

mais il est même faisable dans certains cas de suivre les réactions à l'aide de la RMN du solide alors que le produit est encore lié à son support. En plus de ces méthodes directes de détermination et/ou caractérisation des structures, certaines techniques indirectes sont envisageables dans le cas de la synthèse du type split and mix. Ici, la structure est décryptée grâce à un code généré en parallèle de la bibliothèque. A chaque molécule correspond un code bien précis qui peut être lu *a posteriori*.

#### 4. Identification des molécules actives :

Le développement de ces méthodes de synthèse combinatoire représente une exceptionnelle avancée pour la découverte de molécules actives. Cependant, la principale difficulté réside dans l'identification de ces substances. Les stratégies d'identification structurale sont directement conditionnées par le format sous lequel est présenté un mélange combinatoire.

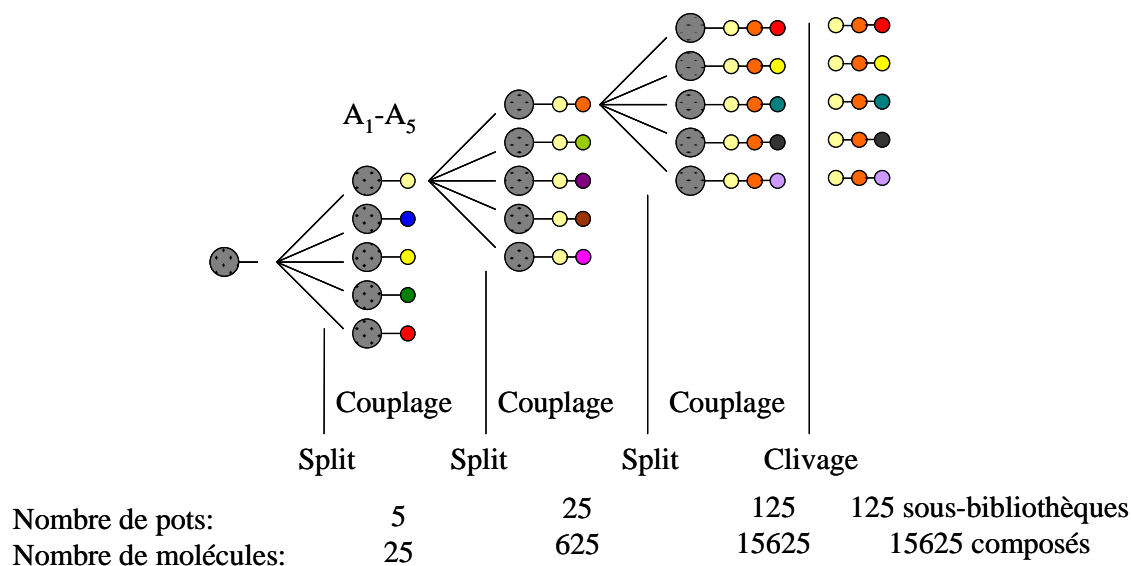
##### 4.1 La "répartition orthogonale" :

Cette méthode repose sur la subdivision de la bibliothèque principale par une série de sous-bibliothèques qui seront évaluées séparément. Deux séries de sous-bibliothèques sont préparées. Pratiquement, si une famille A constituée de cinq unités synthétiques réagit avec une famille B ayant six unités différentes, le nombre de produit final qui peut être formé est égal à 30. Pour élaborer une méthode combinatoire faisant intervenir la répartition orthogonale, il est nécessaire de préparer une série de sous-bibliothèques où l'unité A fixé (par exemple A<sub>1</sub>) réagit avec un mélange de B<sub>1-6</sub>. La deuxième série est constituée de B fixé avec un mélange de A<sub>1-5</sub>. Toutes les sous-bibliothèques sont testées, si le résultat est positif alors deux sous-bibliothèques montreront une activité comme ici les sous-bibliothèques A<sub>2</sub>B<sub>1-6</sub> et A<sub>1-6</sub>B<sub>3</sub>. Connaissant l'unité fixée dans l'une et l'autre des deux séries, il est possible de déterminer la substance active : A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> (Tableau 1).

		A est fixée				
		A <sub>1</sub> B <sub>1-6</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1-6</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>1-6</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>1-6</sub>	A <sub>5</sub> B <sub>1-6</sub>
B est fixée	A <sub>1-6</sub> B <sub>1</sub>					
	A <sub>1-6</sub> B <sub>2</sub>					
	A <sub>1-6</sub> B <sub>3</sub>		A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>			
	A <sub>1-6</sub> B <sub>4</sub>					
	A <sub>1-6</sub> B <sub>5</sub>					
	A <sub>1-6</sub> B <sub>6</sub>					

Tableau 1 : Répartition orthogonale effectuée à partir de 5 unités A et 6 unités B.

Tartar *et coll.*<sup>41</sup> ont développé une technique de synthèse d'une bibliothèque de tripeptides en utilisant 25 monomères différents selon ce principe. Cette technique est basée sur une stratégie de synthèse de type « split » sur support solide (Fig. 17).



**Figure 17** : Exemple de synthèse de bibliothèque orthogonale.

La première étape consiste à séparer la résine en  $n$  lots égaux que l'on couple à  $n$  monomères différents ( $A_{1-5}$ ). Ensuite chaque lot est de nouveau séparé en  $m$  lots égaux qui seront couplés également à  $p$  monomères différents. On obtient ainsi une bibliothèque de  $n \times m \times p \times \dots = X$  produits de séquences connus sur  $X$  billes de résines. Dans ce cas, les monomères sont divisés en 5 groupes  $A_{1-5}$ . La construction d'une bibliothèque se fait de la manière suivante : chaque monomère  $A_{1-5}$  est couplé sur de la résine et les 5 lots de monomères greffés sur la résine sont séparés en 5 lots. Sur chaque lot un acide aminé  $A_{1-5}$  est couplé afin d'obtenir 25 dipeptides. Ceux-ci seront de nouveau séparés en 5 lots auxquels sera couplé chaque monomère  $A_{1-5}$  pour donner après élimination de la résine 125 tripeptides. Une seconde bibliothèque B est préparée selon une stratégie comparable.

#### 4.2 Le "positional scanning" :

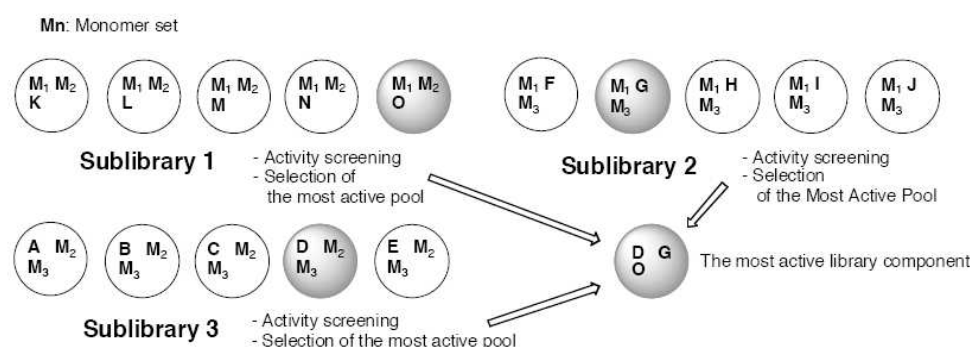
Cette technique développée par Houghten<sup>42</sup> repose sur le même principe de répartition de la bibliothèque en sous-bibliothèques. Cependant, il est possible de l'adapter aux synthèses multi-étapes. Pour chaque position, on prépare autant de sous-bibliothèques qu'il y a de composants.

<sup>41</sup> B. Déprez, X. Williard, L. Bourel, H. Coste, F. Hyafil, A. Tartar. « Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries. » *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5405-5406.

<sup>42</sup> C. Pinilla, J. R. Appel, P. Blanc, R. A. Houghten. « Rapid Identification of High Affinity Peptide Ligands Using Positional Scanning Peptide Combinatorial Libraries. » *Biotechniques* **1992**, *13*, 901-905.



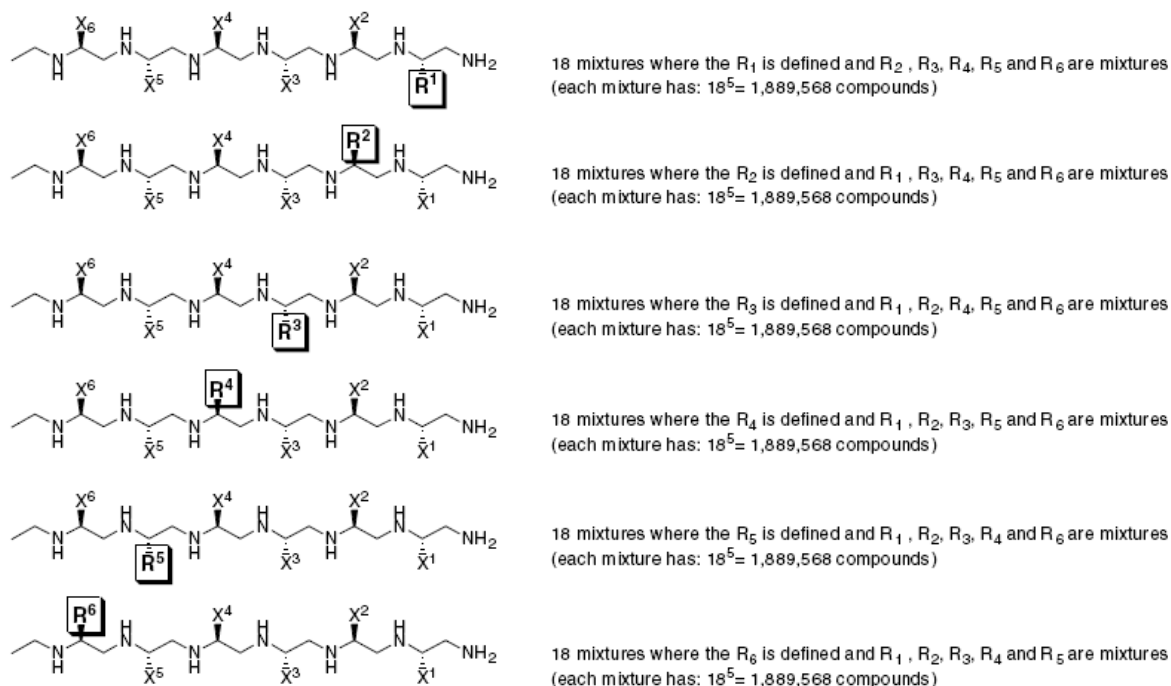
Dans chaque sous-bibliothèque, un des composant est fixé et diffère à chaque fois. La bibliothèque est donc divisée en  $n \times m$  sous-bibliothèques ( $n \times m$  = nombre de sous-bibliothèques,  $n$  = nombre d'étapes combinatoires,  $m$  = nombre de composants). Ainsi après les tests de chaque sous-bibliothèque, il est possible d'identifier un monomère et sa position correspondante et ainsi remonter aux composés actifs (Fig. 18).



**Figure 18 :** Détermination d'une espèce active par "positional scanning" dans une bibliothèque.

Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter de synthèse supplémentaire dans le cas où un composé se révèle actif. Par exemple, Houghten décrit la découverte de ligands du récepteur  $\mu$  d'opioïdes<sup>43</sup> à l'aide de cette technique. A la base, ce sont des hexa-peptides qui sont synthétisés sur résines, puis ces composés sont réduits en amines (Fig. 19). Les hexa-peptides sont synthétisés de façon combinatoire en fixant un acide aminé et en faisant varier les 5 autres parmi 18 possibles. Des amines, dont les groupements R correspondant à la chaîne latérale des acides aminés utilisés vont varier d'une sous-bibliothèque à l'autre. Etant donné qu'il y a 6 positions variables ( $R^1$  à  $R^6$ ), il est nécessaire de synthétiser 6 sous-bibliothèques (Fig. 19).

<sup>43</sup> A. Nefzia, J. M. Ostresha, J. R. Appel, J. Bidlack, C. T. Dooley, R. A. Houghten. « Identification of potent and highly selective chiral tri-amine and tetra-amine  $\mu$  opioid receptors ligands: An example of lead optimization using mixture-based libraries. » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4331-4338.



**Figure 19 :** Synthèse par «Positional scanning» des bibliothèques d'hexa-amine: Synthèse de 6 sous-bibliothèques contenant  $18^6 = 34012170$  composés différents.

Le criblage de chaque sous-bibliothèque est réalisé et pour chaque position, la chaîne latérale présentant la meilleure activité est identifiée et préservée pour construire les molécules actives. Il a ainsi été trouvé des séquences avec des  $IC_{50}$  proche du nM.

### 4.3 Déconvolutions itératives et récursives :

La déconvolution est une des méthodes les plus couramment employées pour déterminer les « hits » positifs trouvés dans les bibliothèques préparées par « split and mix ».

#### 4.3.1 Déconvolution itérative :

La déconvolution itérative est une méthode efficace développée par Houghten<sup>44</sup>. Cette technique est basée sur le concept d'une identification pas-à-pas de chaque unité synthétique nécessaire à l'activité. Néanmoins, elle présente le désavantage d'exiger une nouvelle série de synthèses de bibliothèques de moins en moins complexes, après criblage intermédiaire de l'activité recherchée. Cette stratégie est utilisée jusqu'à ce que le composé actif soit identifié (Fig. 20). En pratique, une bibliothèque composée des éléments M1, M2 et M3 (ou M3 = K, L, M, N ou O) est synthétisée. Le lot le plus actif  $M_1M_2N$  est identifié après le criblage qui met en évidence l'importante de l'élément N dans la séquence. Ceci a conduit à synthétiser les sous-bibliothèques avec un monomère aléatoire  $M_1$  (A, B, C, D, E), un monomère déterminé  $M_2$  (F,

<sup>44</sup> R. A Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, « Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery. » *Nature* **1991**, 354, 84-86

G, H, I, J) et un monomère fixé N. Après le second criblage, la sous-bibliothèque active  $M_1GN$  est identifiée. D'autres synthèses utilisant des monomères déterminés  $M_1$  et des monomères fixés G et N sont effectuées. Celles-ci permettent l'identification de la structure du composé le plus actif DGN.

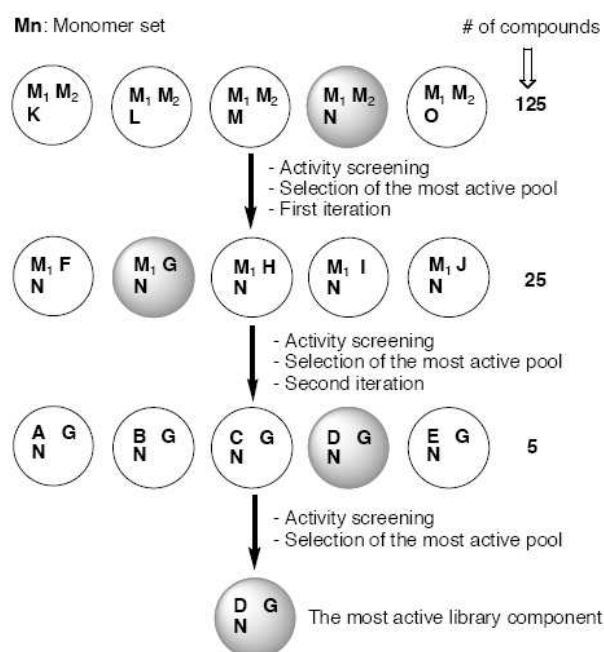


Figure 20 : Déconvolution Itérative.

Dans un des nombreux exemples décrits dans la littérature Dooley *et coll.*<sup>45</sup> ont synthétisé une bibliothèque composée de 400 sous-bibliothèques composées chacune de  $19^4$  hexapeptides de formule générale  $O_1O_2X_3X_4X_5X_6-NH_2$ . O représente une position dans laquelle un acide aminé défini individuellement tandis que X représente un mélange stoechiométrique de 19 acides aminés (cystéine non incluse). A l'issue de cette première sélection, les deux premières positions de la séquence sont identifiées, puis 20 bibliothèques dont la troisième position est définie individuellement sont synthétisées puis testées. Ces étapes sont renouvelées jusqu'à connaître la séquence exacte du peptide ayant une affinité pour la cible.

#### 4.3.2 Déconvolution récursive :

La déconvolution récursive est proche de la précédente. La différence réside dans la construction des sous-bibliothèques. En fait, cette méthode est applicable dans le cas de synthèse combinatoire de type « split and mix ». Après chaque étape de partage et pour un souci

<sup>45</sup> C. T. Dooley, N. N. Chung, P. W. Schiller, R. A. Houghten. « Acetalins: Opioid Receptor Antagonists Determined Through the Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 10811-10815.

de gain de temps, une partie des produits n'est pas mise en réaction pour être stockée et utilisée au moment de la re-synthèse. Cette méthode développée par Brenner *et coll.*<sup>46</sup> est expliquée sur la figure 21. Cette synthèse effectuée sur support solide permet la préparation de 64 produits. A chaque étape de la re-synthèse, une brique synthétique est identifiée.

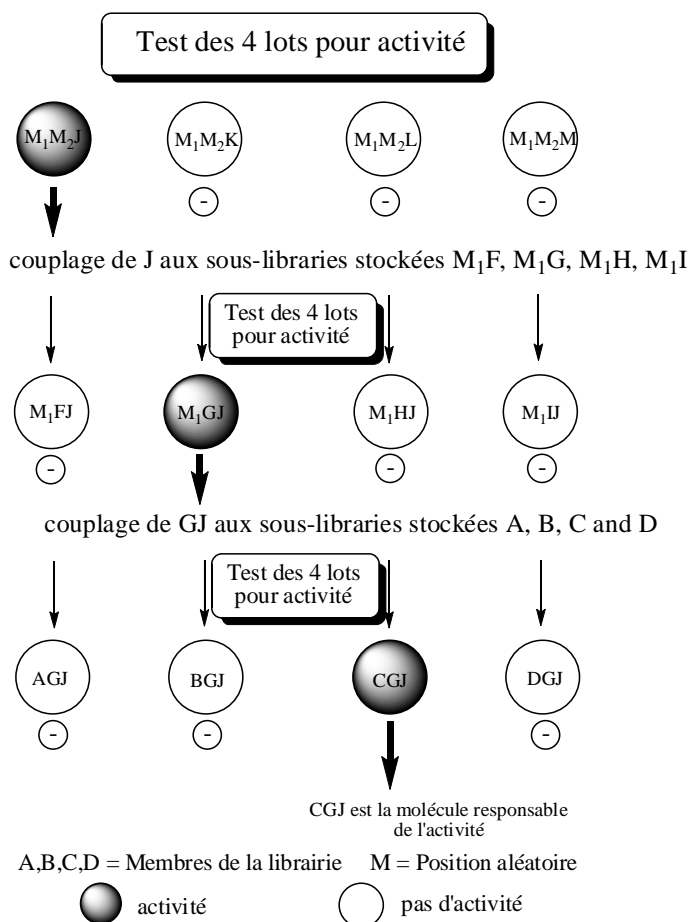


Figure 21 : Déconvolution récursive.

Dans cet exemple, une bibliothèque de trimère est obtenue à partir de quatre composés A, B, C et D. La méthode utilisée est une synthèse en split and mix avec quatre pots réactionnels. Après le premier couplage, une partie de chaque pot est conservé tandis que le reste est introduit dans l'étape de « mix » puis de nouveau séparé en quatre lots pour le prochain couplage jusqu'à la fin de la synthèse pour donner au total 64 produits. Les quatre lots de produits finaux sont ensuite testés (Fig. 21). Si l'un des lots se révèle positif aux tests, par exemple  $M_1M_2J$ , il est alors possible de reprendre les lots  $M_1F, M_1G, M_1H$  et  $M_1I$  précédemment conservé et de les coupler à J pour effectuer les tests. Si par exemple le lot

<sup>46</sup> E. Erb, K. D. Janda, S. Brenner. « Recursive Deconvolution of Combinatorial Chemical Libraries. » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11422-11426.

M1GJ est positif aux tests alors on reprend les lots A, B, C et D que l'on couple à GJ afin d'identifier la séquence exacte du produit actif.

#### 4.4 Codage de bibliothèque :

Il existe un grand nombre de méthodes d'encodage décrites dans la littérature<sup>15,47</sup>. Ces techniques représentent une alternative robuste aux techniques analytiques et à la déconvolution pour déterminer la structure de molécules actives issues d'une bibliothèque. Nous nous limiterons ici aux méthodes d'encodages chimiques.

##### 4.4.1 Principe :

Lors de la synthèse sur support solide, chaque particule de résine porte le produit de synthèse combinatoire, mais également un enregistrement de "l'histoire" synthétique sous la forme d'un code moléculaire. Il convient de noter que le codage qui a été choisi doit être impérativement compatible avec les étapes de la synthèse combinatoire. Il ne doit en aucun cas être détruit au cours du processus, et ne pas induire de changement sur la synthèse. En outre, l'élément de codage ne doit en aucun cas interférer avec la cible lorsque les tests biologiques sont effectués sur les molécules encore liées sur le support. Après les tests, les éléments de codage sont clivés de la résine et identifiés par lecture du code (Fig. 22).

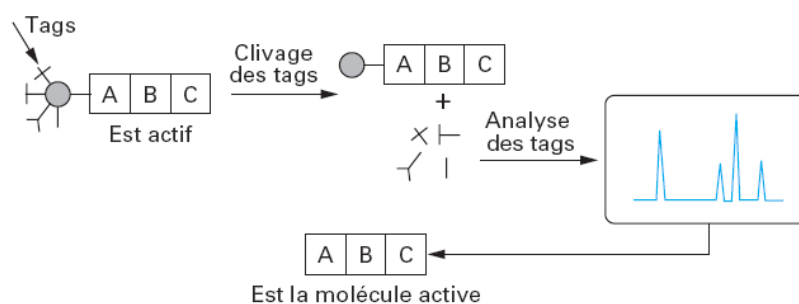


Figure 22 : Principe du codage sur support solide.

L'utilisation de codes chimiques nécessite la manipulation de molécules devant être facilement détectable par des méthodes analytiques classiques (CPG, CLHP, SM) en raison de la faible quantité présente sur le support de synthèse. Parmi les substances susceptibles d'enregistrer ces données, les biomolécules telles que les brins d'ADN et les peptides occupent une place de choix. D'autres méthodes de codage impliquant des électrophiles aromatiques et des amines aliphatiques, peuvent également être utilisées.

<sup>47</sup> A. W. Czarnik. « Encoding Methods for Combinatorial Chemistry. » *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 60-66.

#### 4.4.2 Via brin d'ADN :

L'encodage avec des brins d'ADN fut la première méthode de codage développée par Lerner pour la détermination de structure de séquences peptidiques sur phase solide<sup>48</sup>.

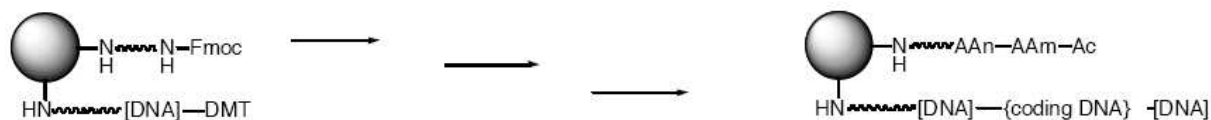


Figure 23 : Codage par des brins d'ADN.

Dans cette méthode, la synthèse du peptide et de l'oligonucléotide se fait sur des sites différents de la bille de résine, où deux groupes protecteurs orthogonaux sont utilisés (Fig. 23). Les acides aminés et le codage sont attachés respectivement sur un site protégé par un groupement Fmoc et diméthyltrytil (DMT). Une fois la synthèse sur support et le criblage réalisés, les billes d'intérêt sont décodées par amplification du bras d'ADN en utilisant la PCR (Polymerase Chain reaction) suivi d'un séquençage de l'ADN. Ceci nécessite la présence d'une amorce sur le brin d'ADN. Cette méthode a été validée par Nielsen *et coll.*<sup>49</sup> qui a confirmé la séquence peptidique de l'épitope de la  $\beta$ -endorphine.

#### 4.4.3 Via brin peptidique :

Une alternative à l'encodage précédent est d'utiliser des brins peptidiques séquençables. Comme avec l'oligonucléotide, le « tag » peptidique est synthétisé indépendamment du ligand en utilisant différentes protections (Fig. 24).

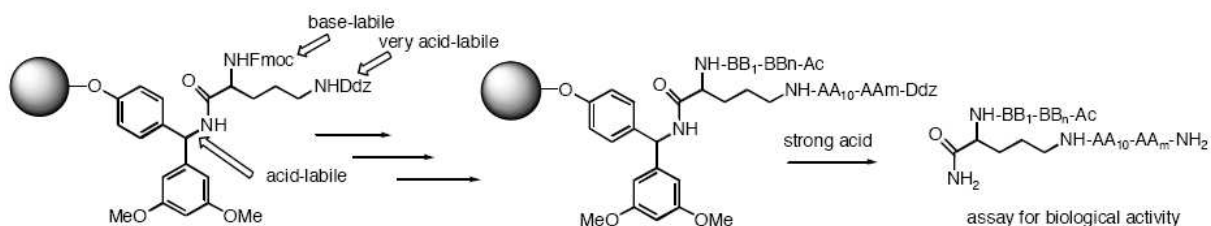


Figure 24 : Encodage via brin peptidique<sup>50</sup>.

Une fois la synthèse terminée, le peptide associé au « tag » est libéré pour réaliser un test en solution. Le décodage du tag peptidique est effectué grâce à la dégradation d'Edman suivi d'une

<sup>48</sup> S. Brenner, R. A. Lerner. « Encoded Combinatorial Chemistry. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 5381-5383

<sup>49</sup> J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda. « Synthetic Methods for the Implementation of Encoded Combinatorial Chemistry. » *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9812-9813.

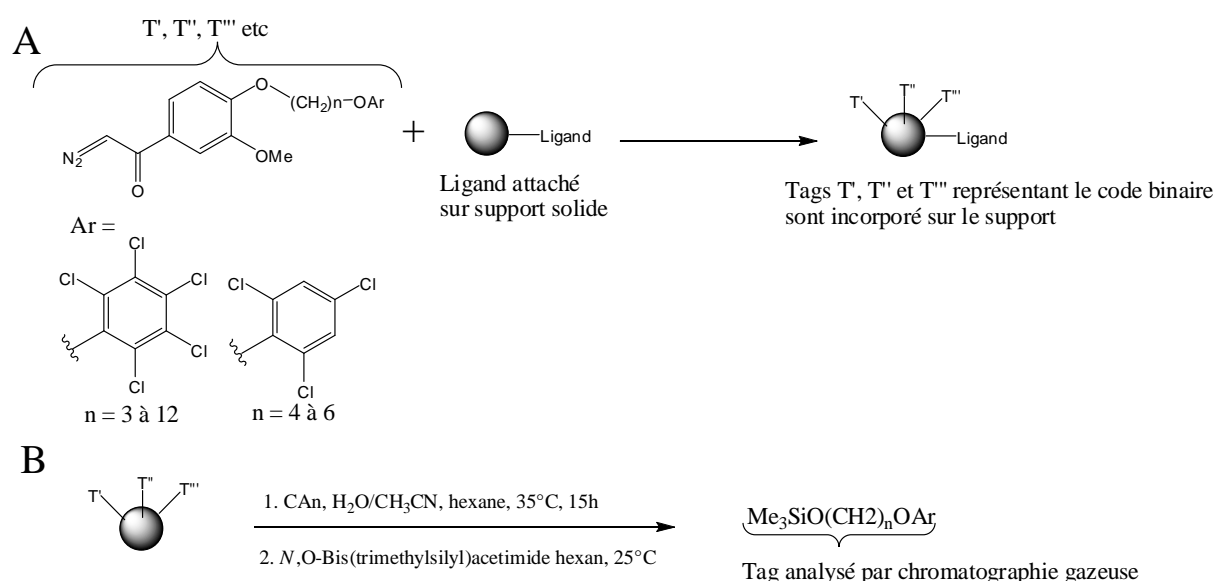
<sup>50</sup> V. Nikolaiev, A. Stierandova, V. Krchnak, B. Seligmann, K. S. Lam, S. E. Salmon, M. Label. « Peptide-encoding for Structure Determination of Nonsequenceable Polymers within Libraries Synthesized and Tested on Solid-phase Supports. » *Pept. Res.* **1993**, 6, 161-170.

analyse CLHP. Cependant, l'instabilité relative de ces bio-polymères (peptides et oligonucleotides) limite ce type de codage pour des conditions chimiques très douces. Une variante à cette technique consiste à utiliser un marquage du code par un nombre contrôlé d'isotope.<sup>51</sup>

#### 4.4.4 Autres méthodes de codage moléculaires :

Deux autres types de tags moléculaires comme les électrophiles aromatiques<sup>52</sup> et les dialkylsulfonamides fluorescents<sup>53</sup> peuvent être utilisés. Il y a quelques avantages d'utiliser ce genres de tags : (i) forte sensibilité (fentomolaire) ; (ii) pas besoin de linker pour attacher le code ; (iii) compatibilité avec les groupes photo-, acide-, et alcalo-labile ; (iv) tolérance à la plupart des réactions de chimie organique.

- *Via électrophiles aromatiques* : Par exemple, Baldwin *et coll.*<sup>54</sup> ont rapporté une technique dans laquelle ils synthétisent une bibliothèque de 6727 molécules encodées à l'aide d'électrophiles aromatiques sous la forme, où chaque agent de marquage est caractérisé par un codage binaire (Fig. 25A).



**Figure 25** : Méthode de greffage et détachement du tag.

<sup>51</sup> H. M. Geysen, C. D. Wagner, W. M. Bodnar, C. J. Markworth, G. J. Parke, F. J. Schoenen, D. S. Wagner, D. S. Kinder. « Isotope or mass encoding of combinatorial libraries. » *Chem. Biol.* **1996**, 3, 679-688

<sup>52</sup> a) P. Eckes. « Binary Encoding of Compound Libraries. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1573-1575 ; b) M. H. J. Ohlmeyer, L. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayshi, M. Wigler, W. C. Still. « Complex Synthetic Chemical Libraries Indexed with Molecular Tags. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 10922-10926.

<sup>53</sup> Z. J. Ni, D. Maclean, C. P. Holmes, M. M. Murphy, B. Ruhland, J. W. Jacobs, E. M. Gordon, M. A. Gallop. « Versatile Approach To Encoding Combinatorial Organic Syntheses Using Chemically Robust Secondary Amine Tags. » *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1601-1608.

<sup>54</sup> J. J. Baldwin, J. J. Burbaum, I. Henderson, M. H. J. Ohlmeyer. « Synthesis of a Small Molecule Combinatorial Library Encoded with Molecular Tags. » *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5588-5589.

Après chaque étape de couplage (méthode split and mix), un lot de tag moléculaire est couplé sur la résine. Après le criblage, le ligand est clivé de la résine grâce à un système d'ancrage photolabile (irradiation par  $h\nu$ ). Les billes présentant une activité sont ensuite soumises à une oxydation puis une silylation permettant la libération des tags moléculaires (Fig. 25B). L'analyse par chromatographie gazeuse permet d'identifier les 3 tags utilisés et ainsi le ligand présent sur la bille. La lecture du tag peut être réalisée par chromatographie gazeuse.

- *Via des dialkylamines aliphatiques* : une autre procédure de codage chimique a été développée par Gallop *et coll.*<sup>53</sup>. Dans ce travail, des amines secondaires sont utilisées comme des lettres d'un code moléculaire en parallèle de la synthèse du composé (Fig. 26).

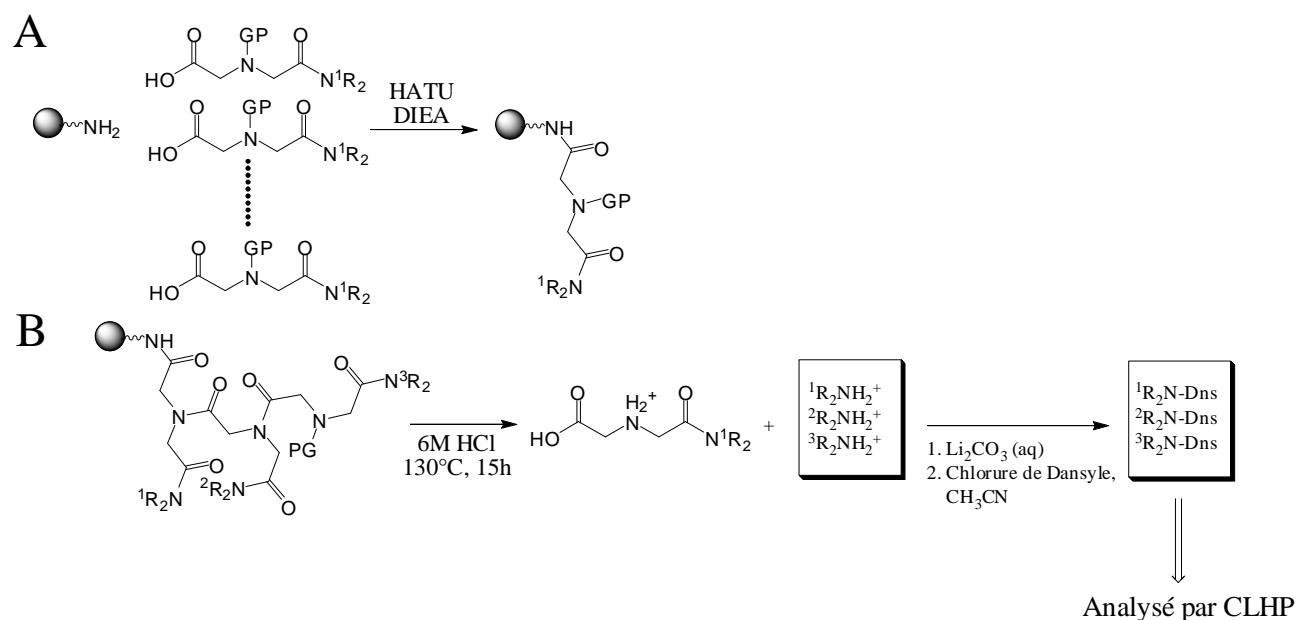


Figure 26 : Codage (A) et décodage (B) des amines secondaires.

Pour le codage (Fig. 26A), les auteurs hydrolysent le code avec de l'acide chlorhydrique 6N. Après dérivation des amines secondaires par du chlorure de dansyle (chlorure de 5-diméthylamino-1-naphtalènesulfonyl), une séparation est effectuée par CLHP. La détection se fait par fluorescence grâce au groupement dansyle (Fig. 26B). Des bibliothèques de  $\beta$ -lactames ou de pyrrolidines ont été codées de cette manière.



## 5. Autres méthodes de chimie combinatoire :

### 5.1 La Chimie Combinatoire Dynamique (CCD) :

Inspiré par le principe de LeChâtelier (Etablie en 1884, la loi de LeChâtelier prévoit que, si l'on modifie les conditions imposées à un système initialement en équilibre stable, ce dernier évolue dans le sens qui tend à le ramener dans son état initial). Alors que la chimie combinatoire est fondée sur de vastes bibliothèques de molécules préfabriquées, la CCD met en œuvre la connexion réversible entre des ensembles d'unités de base pour donner accès à des bibliothèques combinatoires virtuelles dont les constituants forment l'ensemble de toutes les combinaisons possibles, potentiellement réalisables (Fig. 27). La principale différence entre la chimie combinatoire classique et CCD est que la liaison qui lie les différents constituants de la bibliothèque est réversible. Il y a un échange continu entre les différents constituants et donc la composition de la bibliothèque est influencé par un facteur thermodynamique. En présence d'une cible qui stabilise un membre de la bibliothèque, il y aura déplacement de l'équilibre en faveur de ce composé et donc en défaveur des autres espèces. Donc les composés souhaités seront présents en plus grand nombre que ceux non désiré mais portant les même constituants. C'est ici qu'est le principal avantage de la chimie combinatoire dynamique sur la chimie combinatoire traditionnelle<sup>55</sup>.

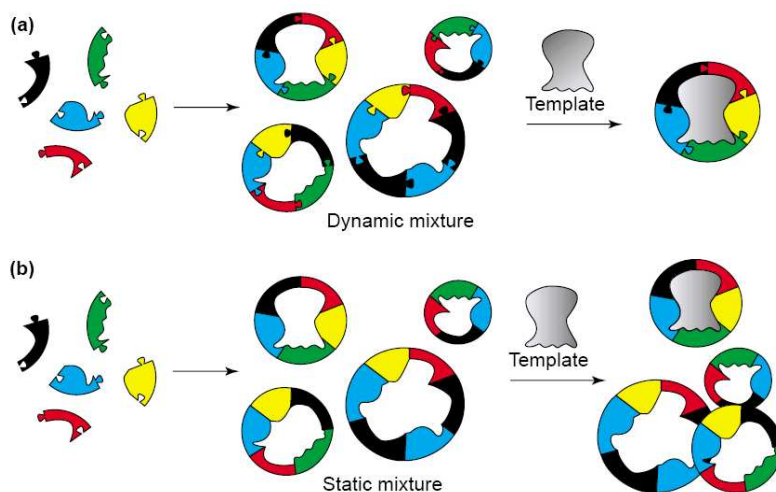
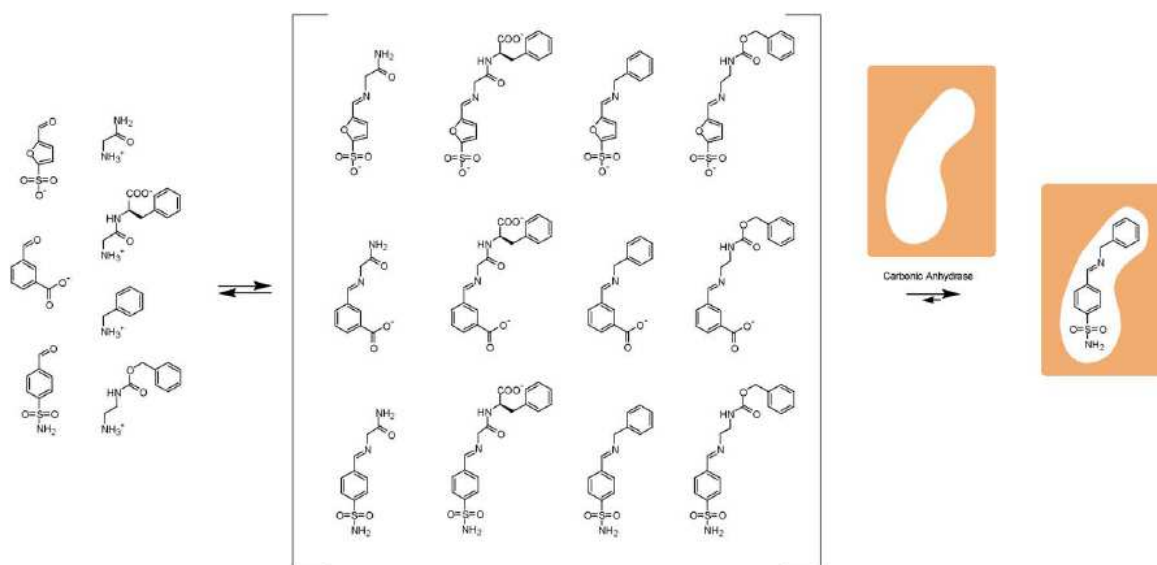


Figure 27 : Chimie dynamique combinatoire (a) contre chimie combinatoire classique (b).

<sup>55</sup> a) S. Otto, R. L. E. Furlan, K. M. Sanders. « Dynamic Combinatorial Chemistry. » *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 117-125;  
 b) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto. « Dynamic Combinatorial Chemistry. » *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3652-3711.

Huc et Lehn ont découvert les éléments clés de la chimie combinatoire dynamique en 1997<sup>56</sup>. Ils démontrèrent le concept en identifiant des inhibiteurs d'anhydrase carbonique en utilisant CCD des imines formés à partir d'amines et d'aldéhyde (Fig. 28). Pour détecter cette imine en CLHP, ils bloquèrent l'équilibre par une réduction irréversible des imines avec  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  pour donner les amines correspondantes.



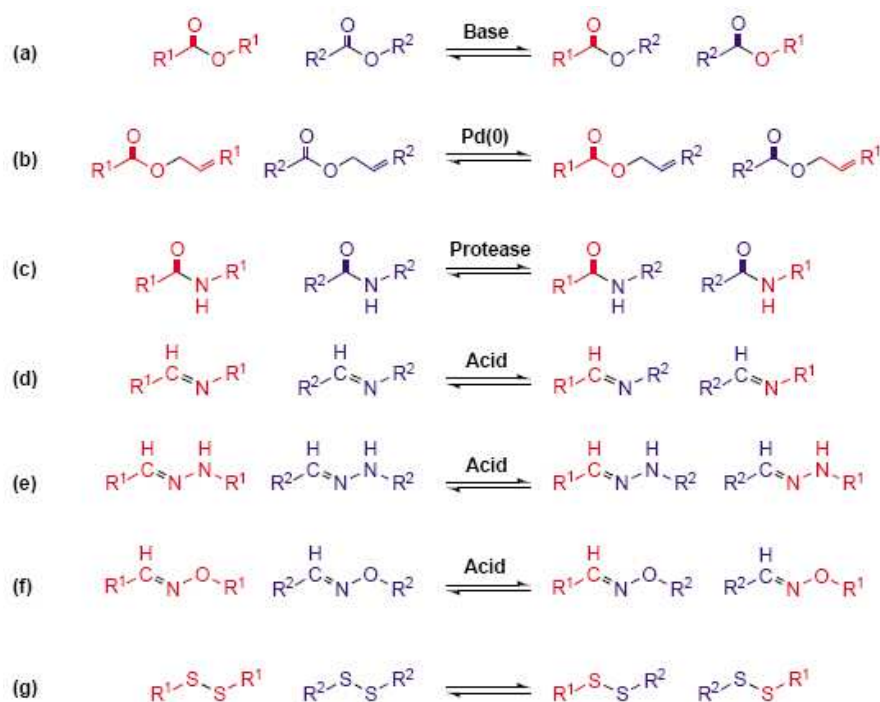
**Figure 28 :** CCD d'imines interagissant avec l'anhydrase carbonique. Un des composés fut sélectionnés et analysé après réduction de l'imine<sup>57</sup>.

La synthèse d'une bibliothèque par chimie combinatoire dynamique comprend trois étapes : i) préparation d'un mélange de molécules inter-convertibles ; ii) amplification du meilleur candidat ; iii) isolement ou resynthèse du meilleur ligand. Le succès de chaque étape dépend largement du type de réaction réversible utilisée. Idéalement une liaison qui s'échange rapidement dans des conditions douces et qui n'interfèrent pas avec la reconnaissance de la cible est un choix privilégié. De plus, il doit être possible de mettre en route ou d'arrêter le processus d'échange sans modifier les propriétés de reconnaissance des molécules.

Pour former la bibliothèque, il faut d'abord choisir un lien qui permettra l'échange. La figure 29 représente un panorama des liaisons covalentes réversibles que l'on peut utilisées en CCD.

<sup>56</sup> Y. Huc, J. M. Lehn. « Virtual Combinatorial Libraries: Dynamic Generation of Molecular and Supramolecular Diversity by Self-assembly. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 2106-2110.

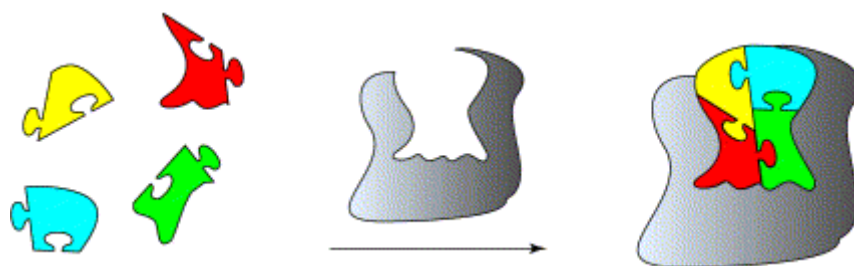
<sup>57</sup> O. Ramstrom, T. Bunyapaiboonsri, S. Lohman, J. M. Lehn. « Chemical Biology of Dynamic Combinatorial Libraries. » *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 178-186.



**Figure 29 :** Liaisons réversibles utilisées en CCD. a) Ester, b) Ester allylique, c) Liaison peptidique, d) Imine, e) hydrazone, f) oxime, g) disulfure (thioester également).

Dans l'élaboration des bibliothèques, deux approches sont envisageables :

- *Assemblage de substrat induit par la présence d'un récepteur* : cette approche consiste à assembler un ligand directement dans le récepteur comme l'illustre la figure 30.



**Figure 30 :** CCD peut être orientés par une cible de type récepteur.

On peut citer les travaux de Ramstrom *et coll.*<sup>58</sup> qui utilisèrent l'échange de la liaison disulfure pour générer une bibliothèque de sucres bivalents (Fig. 31). Cette bibliothèque sera ensuite mise en présence de la lectine Concanavaleine A (ConA) dont le ligand naturel est un trimannose. La bibliothèque est générée à pH neutre voire légèrement basique et l'échange peut être facilement stoppé en diminuant le pH. Afin de séparer les meilleurs ligands, la

<sup>58</sup> O. Ramstrom, J. M. Lehn. « In situ Generation and Screening of a Dynamic Combinatorial Carbohydrate Library against Concanavalin A. » *ChemBioChem* **2000**, *1*, 41-47.

Concanavline A est immobilisé sur des billes de sépharose, ce qui permet par simple filtration d'éliminer les espèces qui n'ont pas une bonne affinité.

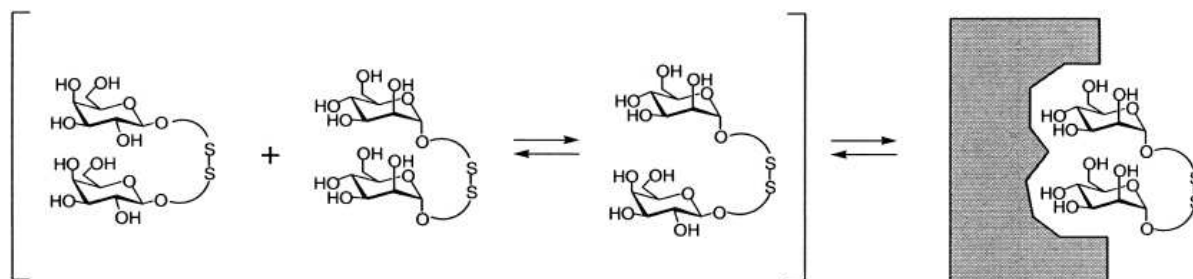


Figure 31 : Représentation schématique de la bibliothèque et la fixation d'une molécule sur la ConA.

Sur la figure 32, on peut voir l'évolution de la répartition des produits au sein de la bibliothèque. Les profils CLHP des dimères de départ (Fig. 32a) et après initiation de l'échange (Fig. 32b) montrent clairement l'efficacité de la méthode. Ensuite, la présence de la ConA et la filtration permet de sélectionner les meilleurs ligands (Fig 32d). Le dimère de mannose est présent majoritairement au sein de ces ligands.

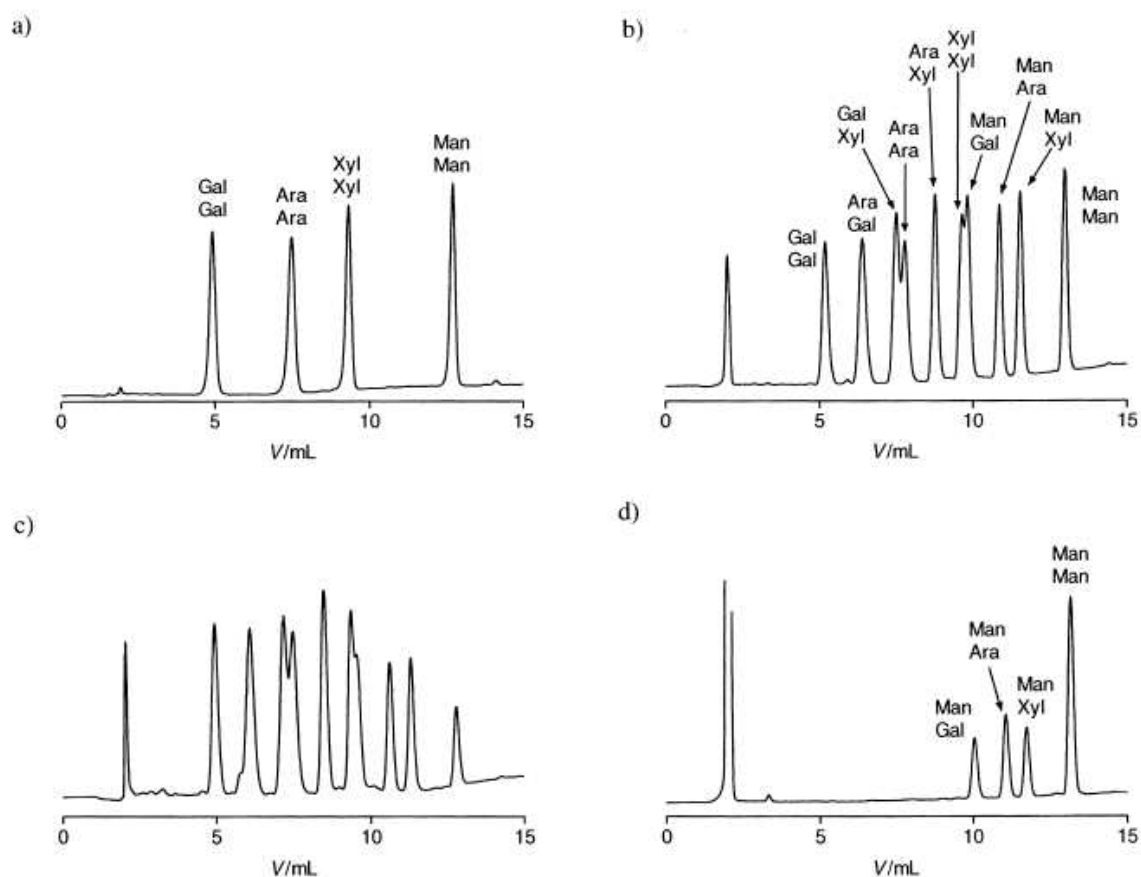


Figure 32 : Profil CLHP de la bibliothèque a) dimères de départ, b) profil à l'équilibre en absence de ConA, c) profil à l'équilibre en présence de ConA, d) profil d'éluion des espèces liées à ConA-sépharose.

Les résultats montrent que la bibliothèque peut être directement criblée *in-situ* en ajoutant la cible dans le mélange de composé à l'équilibre et que la sélection des meilleurs ligands a lieu. Aussi longtemps que l'interconversion chimique n'interfère pas avec les structures ou les fonctions des récepteurs et qu'elle puisse se réaliser dans des conditions douces, nous avons ici une méthode efficace et rapide de criblage de bibliothèques en une seule étape.

- *Assemblage d'un récepteur autour d'un substrat cible* : cette approche consiste à induire la formation d'un récepteur en présence de son ligand (Fig. 33).

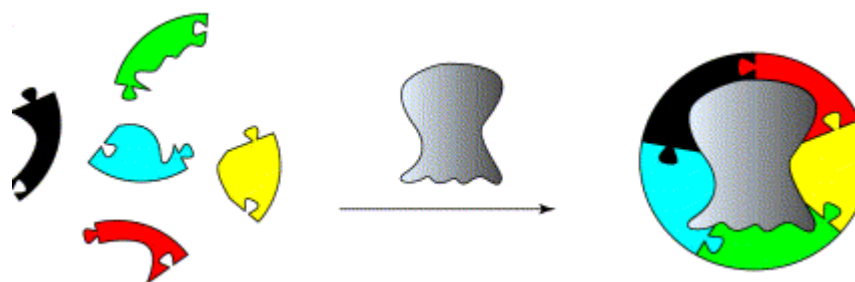


Figure 33 : CCD peut être orientés par une cible de type ligand.

Un des exemples les plus significatifs est la sélection du récepteur de l'acétylcholine dans une bibliothèque combinatoire dynamique de macrocycles des différentes tailles<sup>59</sup> (Fig. 34).

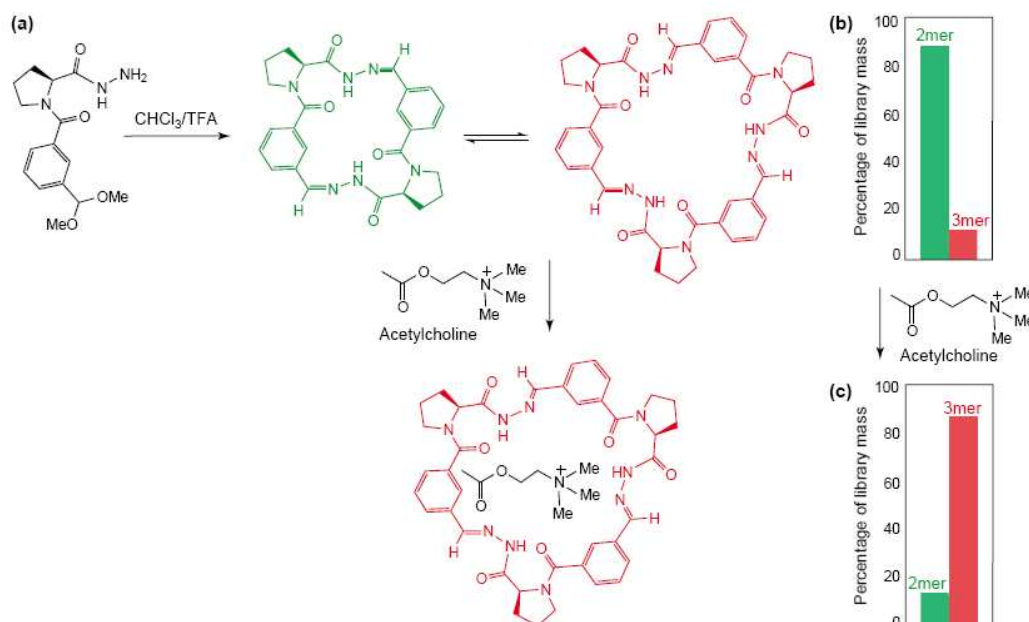


Figure 34 : a) bibliothèque dynamique construite sur liaison hydrazone, b) absence et c) présence de l'acétylcholine.

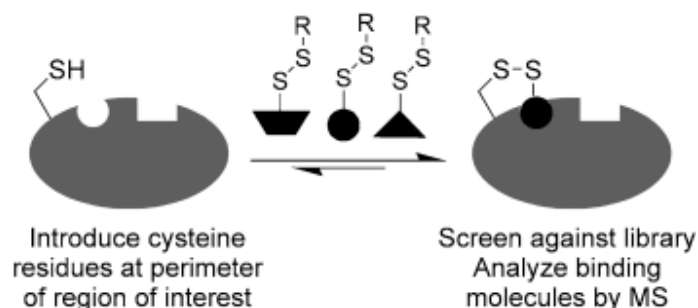
<sup>59</sup> R. L. E. Furlan, Y-F. Ng, G. R. L. Cousins, J. E. Redman, J. K. M. Sanders. « Molecular Amplification in a Dynamic System by Ammonium Cations. » *Tetrahedron* **2002**, 58, 771-778.

La catalyse acide des composés de départ permet la formation d'un mélange de 15 macrocycles qui donnent principalement des dimères. A l'équilibre, 88% sont des dimères et 11% sont des trimères (mélanges de conformères). L'addition de l'acétylcholine à la réaction change significativement l'équilibre et permet d'augmenter 50 fois la concentration du trimère par rapport au dimère (Fig. 34). D'autres anions furent également testés sur cette bibliothèque et ont produits différentes réponses.

Pour conclure, nous pouvons dire que la chimie combinatoire dynamique a le potentiel pour devenir un outil polyvalent dans la découverte de nouvelles molécules d'intérêt. L'amplification des produits désirés par la cible facilite non seulement l'analyse mais permet également un accès rapide à ces composés. Par contre il y a quelques désavantages, comme pour toute méthode qui vient d'être développée. En effet, le nombre de réaction réversible est encore limité et tous les composés formés doivent être solubles afin de ne pas perturber l'équilibre thermodynamique.

## 5.2 La méthode « tethering » :

Cette méthode a été développée pour identifier de petits fragments solubles se liant avec une faible affinité à un site spécifique d'une protéine ou d'une macromolécule. Cette stratégie élaborée par J. E. Wells repose sur la formation d'un pont disulfure entre le ligand et un résidu cystéine sur la protéine d'intérêt<sup>60</sup>. Le résidu cystéine doit alors se trouver à une distance de l'ordre de 5 à 10 angströms du site actif de reconnaissance de la protéine et exposé à la surface pour faciliter les échanges entre thiols. Ainsi, une bibliothèque de molécules présentant des ponts disulfures est mise en présence de la cible modifiée dans des conditions réductrices, favorisant de rapides échanges de thiols comme le montre la figure 35.



**Figure 35** : Principe de la méthode « tethering ».

<sup>60</sup> D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted. « Tethering: fragment-based drug discovery. » *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 199-223.

L'ensemble des produits de la bibliothèque possède une partie spécifique constituée de groupements différents et une partie commune permettant la solubilisation des composés. Si un composé de la bibliothèque ne présente pas d'affinité particulière pour la cible, le pont disulfure formé sera réduit facilement. En revanche, si un composé présente une affinité même faible pour la cible alors le pont disulfure sera stabilisée et la molécule sera sélectionnée puis identifiée par spectrométrie de masse. L'utilisation d'une telle méthode permet de sélectionner des molécules parmi des bibliothèques de centaines de produit présentant des masses différentes.

## **6. Notre Projet de recherche :**

L'objectif de ce travail consiste à développer des stratégies combinatoires pour la découverte de nouveaux ligands à base de peptides cycliques. Pour cela, nous proposons d'explorer deux approches différentes. La première, en solution, sera basée sur l'assemblage aléatoire de motifs oligosaccharidiques et peptidiques sur un peptidique cyclique. Lors de cette approche, nous utiliserons la chimie d'adressage chimiosélective développée depuis plusieurs années au laboratoire. La seconde méthode sera réalisée sur support et permettra *via* la technique « split and mix » de réaliser des peptides cycliques de différentes tailles. Les propriétés de reconnaissance de ces deux types de bibliothèques seront évaluées avec différentes protéines cibles.

### **6.1 Bibliothèques élaborées par assemblage chimiosélectif sur châssis peptidique :**

Les interactions multivalentes sucre/protéine jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus biologiques. La conception et la synthèse de conjugués présentant des motifs saccharidiques organisés en cluster présente donc des intérêts biologiques considérables. La stratégie d'assemblage classique d'un glycocluster consiste à utiliser une molécule présentatrice sur laquelle sont conjuguées plusieurs copies d'un même oligosaccharide. Cependant, des études récentes ont montré que la présentation simultanée d'oligosaccharides différents sur la même molécule, voire la présence d'acides aminés particuliers, pouvaient permettre d'améliorer son affinité et sa sélectivité envers la cible en interagissant sur des sites de reconnaissance secondaires. Dans ce contexte, nous proposons une méthode de synthèse originale permettant d'accéder à des librairies d'hétéroglycoclusters de manière simple et rapide. Notre approche est basée sur l'assemblage chimiosélectif et combinatoire de biomolécules (peptides et oligosaccharides) à la surface de châssis moléculaires RAFT (Fig. 36).

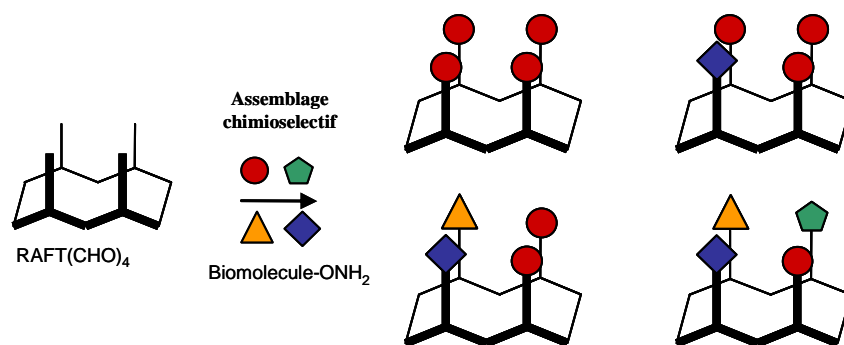


Figure 36 : Principe combinatoire de notre approche.

### 6.1.2 Démarche synthétique :

Le travail que nous proposons est basé sur l'utilisation de décapeptides cycliques (RAFT : « Regioselectively Addressable Functionalized Template ») permettant l'adressage de nos motifs sur une face (dite de reconnaissance) du châssis (Fig. 37). Nous avons en effet montré au laboratoire que ce type de structure présente l'intérêt de combiner plusieurs propriétés qui permettent son utilisation pour diverses applications biologiques.

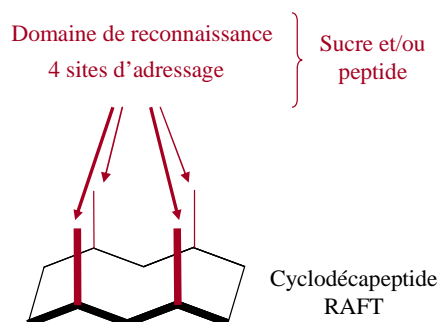


Figure 37 : Représentation schématique du châssis RAFT.

Pour assembler les différents éléments mis en jeu, nous utiliserons une ligation chimiosélective éther d'oxime qui permet de conjuguer nos biomolécules complètement déprotégées. Ce type de ligation nécessite la préparation des partenaires correspondants : une fonction aldéhyde (ou cétone) et une fonction oxyamine. Dans notre approche, le châssis sera fonctionnalisé par quatre aldéhydes sur son domaine de reconnaissance et les peptides et oligosaccharides seront fonctionnalisés par une oxyamine.

### 6.1.3 Déroulement du travail :

La première partie du travail a consisté tout d'abord à synthétiser les différents partenaires correctement fonctionnalisés, puis à mettre au point les conditions opératoires pour réaliser



l'assemblage. Nous avons choisi de synthétiser des biomolécules (sucres et acides aminés) pour introduire une diversité et des spécificités différentes sur nos châssis moléculaires.

- *Synthèses des synthons* (Chapitre 1) : nous avons choisi la stratégie de synthèse peptidique utilisée au laboratoire ces dernières années pour préparer les peptides cycliques contenant les fonctions aldéhydes. La synthèse de ligands peptidiques modèles fonctionnalisés par un groupe oxyamine a permis de développer un nouveau réactif extrêmement utile pour accéder à ce type de dérivé de manière efficace et propre. Nous avons ensuite synthétisés des acides aminés modifiés, en utilisant ce protocole de fonctionnalisation. La synthèse des sucres oxyamines s'est déroulée selon une méthodologie développée au laboratoire et permettant d'introduire en position anomère une fonction oxyamine. Nous avons choisi des sucres qui constituent les structures de base de la plupart des éléments de reconnaissance biologique.

- *Assemblage combinatoire et criblage* (Chapitre 2) : une étude rigoureuse des conditions opératoires nécessaires à la formation et à la purification de nos bibliothèques en solution a d'abord été réalisée avec les peptides modèles. Nous avons ensuite préparé deux types de bibliothèques et sous-bibliothèques d'hétéroclusters composés de sucres et d'acides aminés. Afin de valider notre approche, ces mélanges ont ensuite été criblés sur une lectine modèle, la Concanavalline A. Le criblage s'est déroulé par colonne d'affinité puis les molécules sélectionnées ont été isolées. Leur étude par SPR (Surface Plasmon Resonance) a permis de confirmer le résultat du criblage et le potentiel de reconnaissance de certains composés.

## **6.2 Bibliothèques de peptides cycliques par « split and mix » : (chapitre 3)**

La deuxième approche combinatoire réalisée dans ce travail a permis d'explorer un autre aspect de la chimie combinatoire : la synthèse sur phase solide. Les peptides cycliques sont l'objet d'attention particulière en raison de leur stabilité contre les dégradations protéolytiques et de la source importante de composés biologiquement actifs qu'ils représentent dans la nature. Pour découvrir de nouveaux peptides cycliques actifs la chimie combinatoire est largement employée<sup>61</sup> en particulier par la méthode « split and mix ». Cependant, comme

---

<sup>61</sup> a) Q. Xiao, D. Pei. « High-throughput Synthesis and Screening of Cyclic Peptide Antibiotics. » *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3132-3137; b) M. S. Donia, B. J. H. Hathaway, S. Sudek, M. G. Haygood, M. J. Rosovitz, J. Ravel, E. W. Schmidt. « Natural Combinatorial Peptide Libraries in Cyanobacterial Symbionts of Marine Ascidiarians. » *Nature Chem. Biol.* **2006**, 2, 729-735;

nous l'avons vu en introduction, la synthèse combinatoire demande une identification après criblage des peptides actifs. Jusqu'à récemment la détermination de séquence des peptides cycliques était un problème majeur. Pour cela, une méthode très efficace développée récemment par l'équipe du Pr. J.-L. Reymond à l'Université de Berne permet de décoder la séquence de peptides sans avoir recours à des marquages moléculaires.

### 6.2.1 Démarche synthétique :

Dans cette deuxième partie, nous proposons d'étudier la synthèse de bibliothèques de peptides cycliques de différente taille. Les bibliothèques de peptides seront préparées par « split and mix » et décodées par la méthode d'encodage mise au point à l'Université de Berne<sup>62</sup> par l'équipe du Pr. J.-L. Reymond.

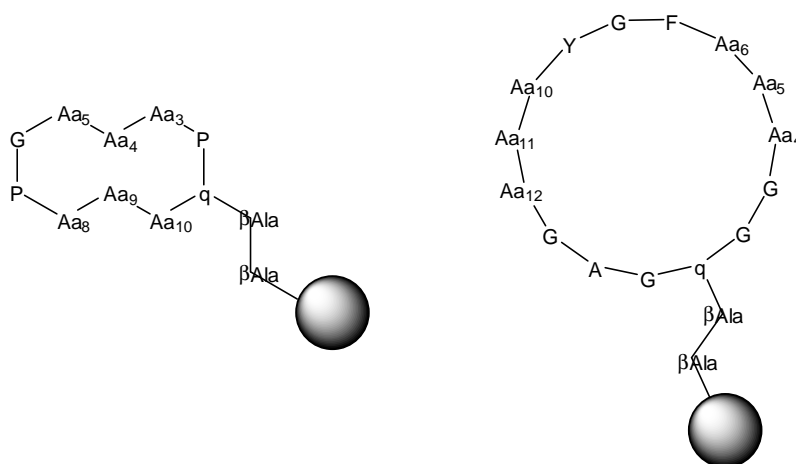


Figure 38 : Type de Bibliothèques de peptides cyclique réalisées.

La cyclisation des peptides sera réalisée sur support grâce à l'incorporation de l'acide D-glutamique comme point d'ancrage sur la résine selon le protocole développé au laboratoire (Fig. 38).

### 6.2.2 Déroulement du travail :

Une première bibliothèque de cyclodécapeptide est réalisée selon le design des châssis moléculaire RAFT afin de valider la méthodologie. Le criblage et le décodage de cette librairie a notamment permis de mettre en évidence des séquences peptidiques capables de lier la vitamine B12 avec une bonne affinité. Des études structurales visant à déterminer les sites

c) X. Zang, Z. Yu, Y. H. Chu. « Tight-binding Streptavidin Ligands from a Cyclic Peptide Library. » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2327-2332.

<sup>62</sup> J. Kofoed, J.-L. Reymond. « A General Method for Designing Combinatorial Peptide Libraries Decodable by Amino Acid Analysis. » *J. Comb. Chem.* **2007**, sous presse.

d'interactions entre les séquences peptidiques actives et la vitamine B12 ont été réalisées par RMN.

Une seconde bibliothèque de peptides cycliques de plus grande taille a également été préparée dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. C. Cochet (CEA, Grenoble). Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les deux sous-unités de la Caseine Kinase II (CK2). Il a en effet été montré que des peptides cycliques présentent des propriétés inhibitrices de l'interaction entre ces deux protéines. En particulier, les acides aminés impliqués dans cette interaction ont ainsi été clairement identifiés. En tenant compte de ces considérations structurales, une bibliothèque de peptides cycliques de 15 acides aminés a été synthétisée. Le criblage sur la protéine CK2 est en cours.

---

*Chapitre 1 :*  
*Synthèse des synthons*

---

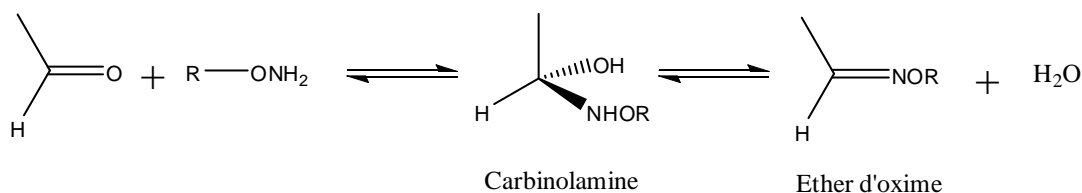


## Chapitre 1 : Synthèse des synthons

Notre première approche combinatoire est basée sur l'assemblage chimiosélectif de ligands oxyamine sur un châssis cyclopeptidique RAFT fonctionnalisé par des aldéhydes. Pour cela, nous devons synthétiser les différents synthons (ou briques de constructions) nécessaires lors de l'assemblage. Dans un premier temps, nous décrirons les principes de la synthèse peptidique, la synthèse des synthons peptidiques (RAFT, peptides modèles et acides aminés), puis la synthèse des sucres oxyamines.

### 1. La ligation oxime :

Les liaisons chimiosélectives représentent des méthodes de ligation de biomolécules extrêmement efficaces. Parmi celles-ci, la ligation oxime étudiée pour la première fois par K. Rose<sup>63</sup> pour la synthèse de protéines artificielles est particulièrement attrayante. Cette réaction est en effet compatible avec une large variété de fonctions chimiques et permettent la formation de liaisons entre fragments déprotégés et sans agent de couplage.



**Schéma 1 :** Mécanisme de formation d'une liaison éther d'oxime.

Elle présente également d'autres avantages : i) le risque de réaction secondaire est quasi inexistant car les réactifs sont parfaitement chimiosélectifs ; ii) cette réaction met en jeu une fonction carbonylée (aldéhyde) et une fonction oxyamine dans un tampon aqueux (pH 4-6) et dans des conditions douces (Schéma 1) ; iii) cette réaction est très rapide et extrêmement efficace (haut rendement).

Au sein de notre laboratoire nous utilisons depuis quelques années la liaison oxime<sup>64</sup> pour conjuguer des biomolécules entre elles telles que des peptides, des sucres ou des oligonucléotides. Le choix de ce lien s'est donc imposé naturellement dans notre stratégie

<sup>63</sup> K. Rose. « Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins. » *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

<sup>64</sup> D. Forget, D. Boturn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy. « Highly Efficient Synthesis of Peptide-oligonucleotide Conjugates: Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation. » *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.

puisque nous disposons au laboratoire de méthodes chimiques efficaces pour fonctionnaliser nos différents partenaires.

## 2. La synthèse peptidique<sup>65</sup> :

Les peptides et leurs dérivés font l'objet d'une attention considérable depuis une quarantaine d'années. La meilleure compréhension de leurs divers rôles physiologiques, associée à leur production plus efficace par synthèse et voie biotechnologique a stimulé un intérêt croissant pour leurs applications pharmacologiques potentielles. Ainsi de nombreux peptides biologiquement actifs ont été découverts à ce jour et une multitude de leurs analogues synthétiques ont été testés. Les approches conventionnelles de synthèse peptidique ont connu un énorme succès grâce aux progrès réalisés dans le domaine des réactifs de couplage plus efficaces et moins racémisants, ainsi que dans le développement de groupements protecteurs, de nouvelles résines de synthèse et de robots synthétiseurs. Ce succès et ces innovations sont à l'origine du développement de méthodes combinatoires pour l'obtention de bibliothèques peptidiques.

### 2.1 Principe :

Contrairement aux processus de biosynthèse, la synthèse chimique de peptides s'effectue de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Néanmoins, les chimistes ne disposant ni de l'efficacité, ni de la sélectivité de la machinerie génétique ont dû développer des méthodes spécifiques pour résoudre les difficultés intrinsèques à la synthèse peptidique. La première est la formation de la liaison peptidique entre acides aminés dans des conditions suffisamment douces pour garantir l'intégrité du produit, tout en évitant la formation de produits secondaires issus de réactions de racémisation. Pour cela, de nombreuses méthodes ont été développées<sup>65</sup> permettant l'activation de la fonction acide afin de faciliter son attaque nucléophile par la fonction amine de l'acide aminé suivant (Fig. 39). Parmi ces méthodes, nous pouvons citer l'activation par les halogénures d'acides aminés, les anhydrides mixtes et les esters activés<sup>66</sup>. Ces dernières années, l'utilisation de réactifs de couplage comme le PyBOP<sup>®67</sup> et HATU<sup>68</sup>, permettant de former ces dérivés directement *in situ*, s'est largement

---

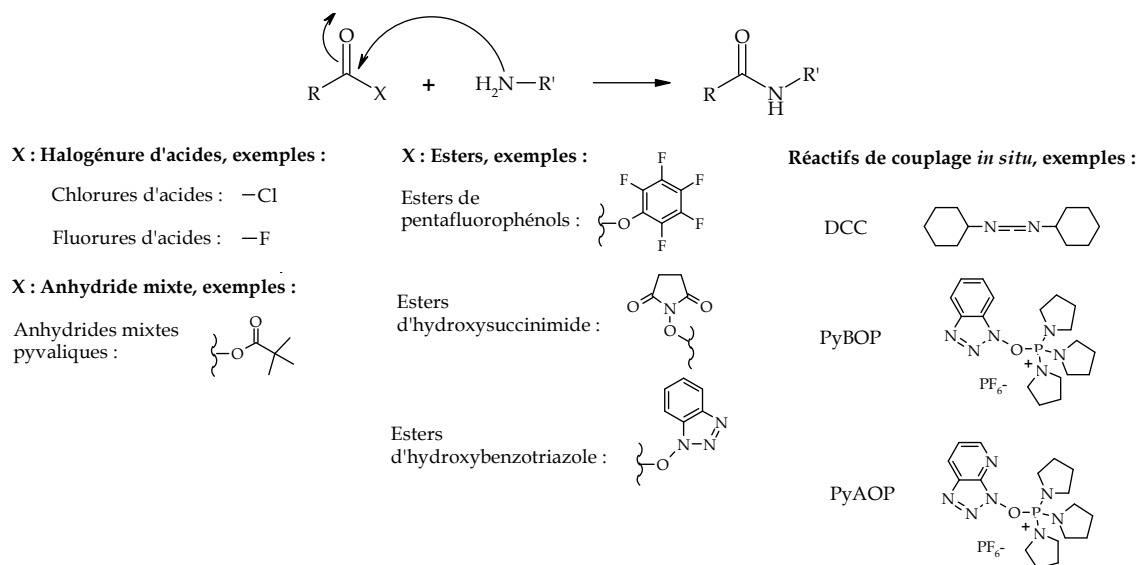
<sup>65</sup> a) P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt. « Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. » CRC Press LLC ed. Boca Raton New York, **1997**; b) T. W. Greene, P. G. M. Wuts. « Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. » Oxford university press, **2000**.

<sup>66</sup> M. Bodansky. « Peptide Chemistry. A practical Text Book. » Springer Verlag eds., Berlin Heidelberg, **1993**.

<sup>67</sup> J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro. « PyBOP<sup>®</sup>: a New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic By-product. » *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.

<sup>68</sup> L. A. Carpino. « 1-hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. » *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.

développée au point de devenir vraisemblablement la méthode la plus employée<sup>69</sup>.



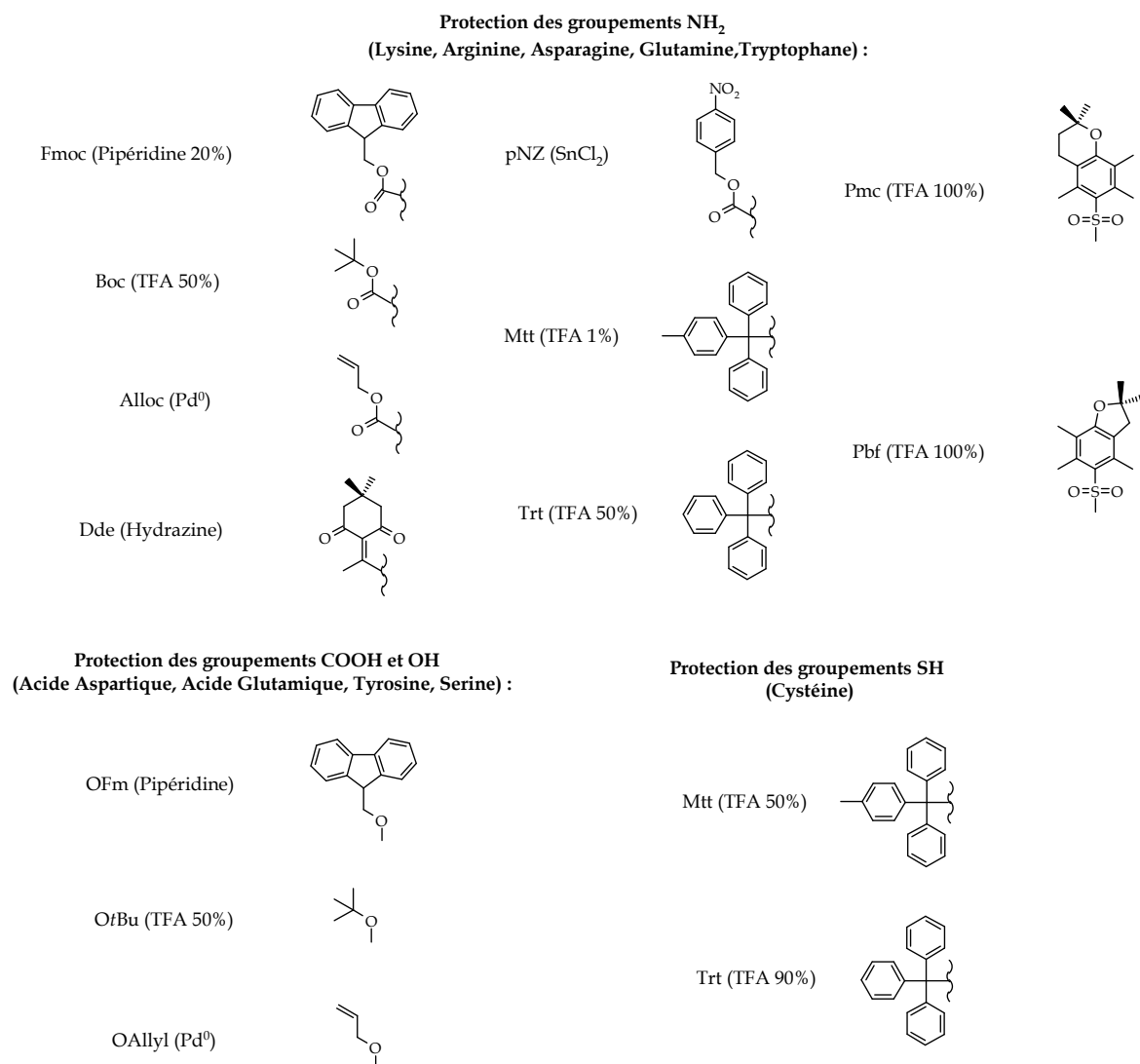
**Figure 39 :** Différentes stratégies d'activation de la fonction acide

Le contrôle de la formation de la liaison peptidique souhaitée, par réaction de la fonction acide d'un premier acide aminé avec la fonction amine d'un second, nécessite que toutes les fonctions n'intervenant pas dans la réaction soient protégées. Dans cette optique, de nombreux groupements protecteurs orthogonaux ont été développés<sup>70</sup>. L'élongation de la séquence demande ensuite que la fonction N-terminale du peptide puisse être déprotégée sélectivement de manière à pouvoir réagir avec l'acide aminé suivant. Les groupes protecteurs utilisés et destinés à être retirés en cours de synthèse de façon répétitive, sont qualifiés de « groupes temporaires » (groupement Fmoc ou Boc selon la stratégie d'assemblage). En général les chaînes latérales des acides aminés restent protégées tout au long de l'élongation de la séquence pour n'être libérées qu'en fin de synthèse. Nous employons pour cela des groupements protecteurs dits « permanents ». Cependant, certaines synthèses nécessitent la fonctionnalisation sélective de la chaîne latérale d'un acide aminé de la séquence. Dans ce cas précis, nous avons alors recours à des groupements protecteurs dits « semi-permanents » (Fig. 40).

<sup>69</sup> J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin. « Chemical Synthesis of Natural Product Peptides : Coupling Methods for the Incorporation of Noncoded Amino Acids into Peptides. » *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2243-2266.

<sup>70</sup> a) W.C. Chan, P.D. White. « Protective Groups in Organic Synthesis. » John Wiley and Sons eds., New York, **1991**; b) M. Schelhaas, H. Waldmann. « Protecting Group Strategies in Organic Synthesis. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2056-2083.





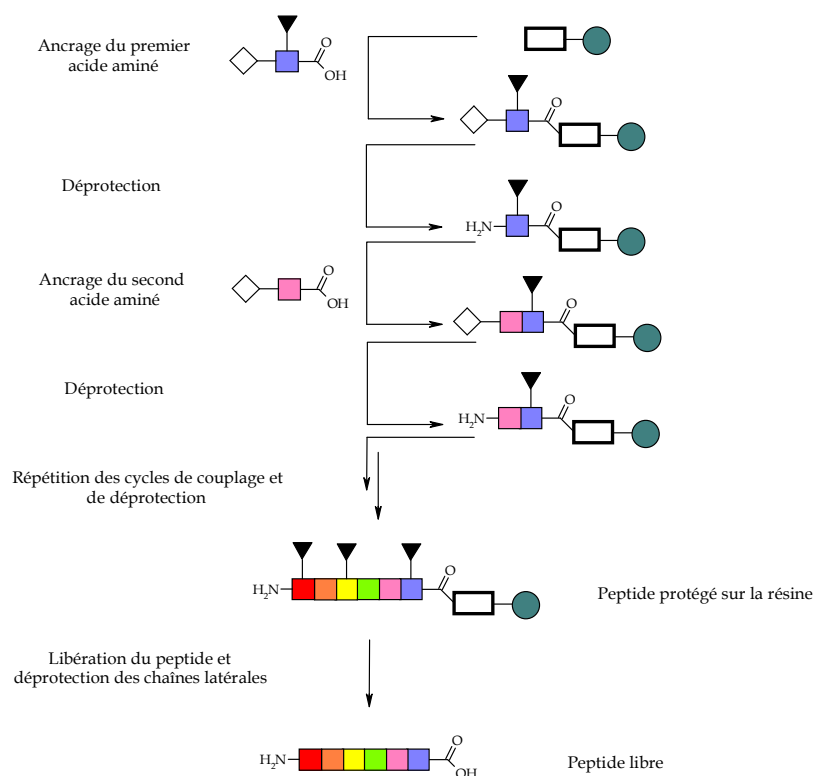
**Figure 40** : Exemples de greoues protecteurs permanents ou semi-permanents utilisés en startégie Fmoc. Les conditions de déprotections sont indiquées entre parenthèses.

Tous ces groupements protecteurs doivent pouvoir être éliminés de façon sélective. On parle alors de groupes protecteurs orthogonaux. Le choix de déprotection est donc un aspect extrêmement important de la synthèse peptidique qui conditionne fortement sa réussite. Cela passe notamment par la maîtrise de nombreux groupes protecteurs pouvant être introduits ou éliminés avec le maximum d'efficacité, dans des conditions assez douces pour garantir l'intégrité du produit.

## 2.2 Synthèse Peptidique sur Phase Solide :

L'essor des réactifs de couplage, ainsi que le développement de nombreuses résines de synthèse, a permis le développement exceptionnel des méthodes de synthèse peptidique sur phase solide (SPPS). La SPPS fut introduite par R. Bruce Merrifield en 1963<sup>16</sup>, puis développée et perfectionnée de telle sorte qu'il est aujourd'hui possible d'assembler des

chaînes polypeptidiques comportant plus de cent acides aminés<sup>17</sup>. L'assemblage d'une chaîne polypeptidique est une procédure itérative, alternant cycles de couplage et de déprotection permettant ainsi son automatisation. En SPPS, les peptides ne sont pas assemblés en solution mais sur un support insoluble. Ce support est une résine polymère (le plus souvent du polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène<sup>71</sup>) qui gonfle dans les solvants utilisés et au sein de laquelle a lieu la synthèse peptidique. Le principe de cette méthode est relativement simple comme le décrit la figure 41.



**Figure 41 :** Principe de la synthèse peptidique sur phase solide. Les acides aminés sont représentés par des carrés, les groupes protecteurs temporaires N- $\alpha$  par des losanges, ceux des chaînes latérales par des triangles, le linker par un rectangle et la résine par un cercle (selon F. Albericio<sup>65</sup>).

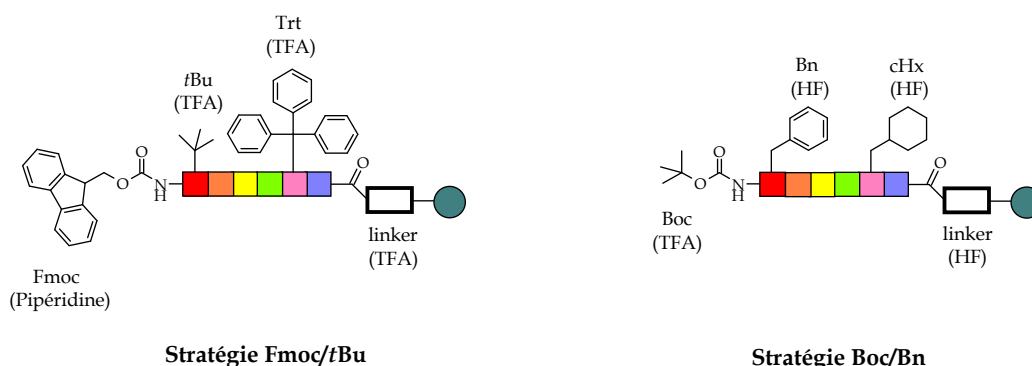
L'acide C-terminal de la séquence à synthétiser, protégé sur sa fonction N- $\alpha$  et si besoin sur sa chaîne latérale, est accroché chimiquement sur le support solide. Cela s'effectue le plus souvent par l'intermédiaire d'une molécule qui sert de lien entre le peptide et la résine (le linker) et qui pourra être éliminée en fin de synthèse, généralement par traitement à l'acide, pour libérer le peptide. La stabilité chimique de ce bras espaceur conditionne la libération du peptide en fin de synthèse. L'élongation du peptide est alors effectuée par des cycles itératifs d'élimination du groupe protecteur N- $\alpha$ , puis couplage de l'acide aminé protégé suivant. De

<sup>71</sup> D. C. Sherrington. « Preparation, structure and morphology of a polymer support. » *J. Chem. Comm.* **1998**, 20, 2275-2286.

plus, il est possible de réaliser des étapes d'acétylation, « masquage » ou « capping » à la suite d'une étape de couplage afin de bloquer les sites amines n'ayant pas réagi.

L'utilisation d'un support insoluble où le peptide en construction est fixé, permet l'emploi d'excès de réactifs, nécessaire pour que chaque réaction de couplage ou de déprotection soit rapide et complète. Par la suite, ces réactifs sont facilement éliminés par simples filtrations suivies de plusieurs lavages. Les étapes de purification et d'isolement des intermédiaires deviennent ainsi superflues et il est alors possible d'assembler une séquence peptidique beaucoup plus rapidement que par synthèse en solution. A la fin de l'élongation de la séquence, le peptide est décroché de la résine et les chaînes latérales déprotégées. Il peut alors être purifié et caractérisé.

Il existe deux stratégies de synthèse en SPPS : la stratégie Boc/Bn et Fmoc/tBu (Fig. 42). La stratégie Boc/Bn utilise le groupement Boc (tertiobutyloxycarbonyle) comme groupe protecteur temporaire de la partie N- $\alpha$  et des groupes protecteurs de type benzyle ou cyclohexyle sur les chaînes latérales. Dans cette approche, le groupement Boc est coupé par acidolyse à l'acide trifluoroacétique et le peptide est coupé de la résine et déprotégé par acidolyse à l'acide fluorhydrique. La stratégie Fmoc/tBu quant à elle, utilise le groupement Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyle) comme groupe protecteur temporaire et les groupements *ter*butyle ou trityle pour les chaînes latérales des acides aminés. Dans cette stratégie, le groupement Fmoc est coupé en milieu basique (par une amine secondaire comme la pipéridine) et le peptide est libéré de la résine et déprotégé par acidolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA).



**Figure 42** : Stratégie de synthèse en SPPS (conditions de coupure).

L'itérativité et l'efficacité de la méthode ont permis son automatisation et de ce fait, ont contribué au développement de la chimie combinatoire sur peptides. Néanmoins, il est à noter que la synthèse peptidique sur phase solide présente certaines limites. Tout d'abord, étant donné que le peptide reste lié à la résine pendant toute la durée de la synthèse, il est difficile de suivre l'évolution des réactions. Il existe pour cela des moyens de contrôle qui interviennent lors des 2 étapes répétitives de la SPPS. En effet, après chaque couplage les tests du TNBS<sup>72</sup> et Kaiser<sup>73</sup> permettent de vérifier si le couplage est total ou si il reste des amines libres. Egalement après chaque déprotection du groupement Fmoc la quantité d'aduit dibenzofulvène pipéridine est mesurée par absorbance afin de vérifier si cette réaction est totale. De plus, les intermédiaires ne peuvent ni être purifiés ni caractérisés, ce qui limite tout contrôle de la synthèse. Il existe toutefois des méthodes de suivi des cycles de déprotection et de couplages qui sont décrites ci-après. Par ailleurs, si les réactions de couplage ou de déprotection ne sont pas quantitatives, des séquences peptidiques différentes de celle attendue (séquences incomplètes) vont s'accumuler sur la résine et donner un mélange en fin de synthèse dont il sera difficile d'isoler la séquence désirée.

### 2.3 Types de support en SPPS :

La nature du support est un élément à choisir soigneusement selon plusieurs critères avant toute synthèse. Ce support est un polymère synthétique qui doit présenter une bonne solvation dans les solvants organiques employés au cours du cycle d'élongation (DMF, pipéridine/DMF), sans être solubilisée. La résine doit gonfler et être bien perméable pour exposer tous les sites aux réactifs de synthèse. Elle doit tout d'abord être choisie en fonction du type de peptide que l'on veut obtenir (acide, amide, ester, alcools, protégé ou non). Il faut ensuite considérer les conditions de coupure du peptide de son support pour le récupérer soit entièrement protégé, soit entièrement déprotégé. Enfin, dans le cas où un criblage avec la cible biologique doit être réalisé sur le support, il faut alors choisir une résine qui soit adaptée aux tampons utilisés lors du test.

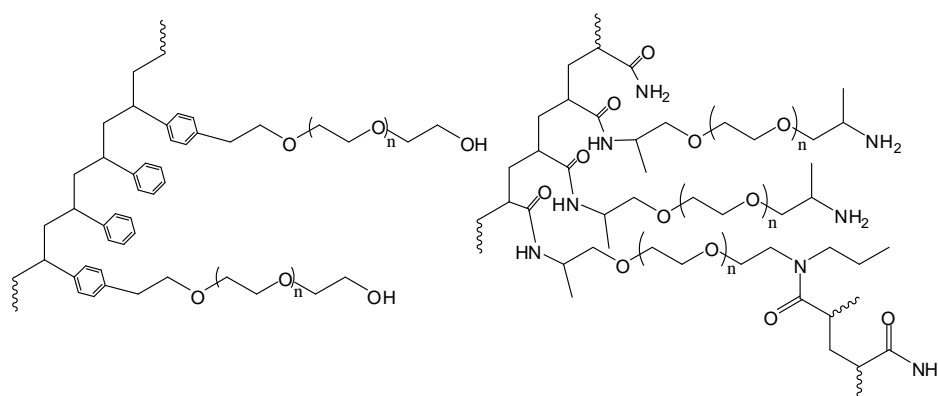
Le facteur qui permet d'influencer la solvation de la résine est le type de support. Les supports polystyrène (PS) utilisés jusque dans les années 80 se tassent dans les solvants polaires et enfouissent le peptide, et à l'inverse gonflent dans les solvants apolaires. Le

---

<sup>72</sup> W. S. Hancock, J. E. Battersby. « A New Micro-test for the Detection of Incomplete Coupling Reaction in Solid-phase Synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. » *Anal. Biochem.* **1976**, 71, 261-264.

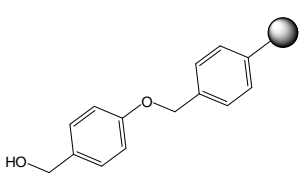
<sup>73</sup> E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. I. Cook. « Color Test for Detection of Free Terminal Amino Group in the Solid-phase Synthesis of Peptides. » *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.

greffage de bras porteurs polaires comme le polyéthylène glycol (résines PEG) est une avancée qui a permis d'utiliser les résines dans des solvants polaires. Ce type de résine est maintenant largement employé lors des criblages directement sur résine. Les supports PEG-Polystyrène ou Tentagel et PEGA (PolyEthylène Glycol Amine) sont essentiellement employés pour les tests réalisés directement sur résine (Fig. 43).

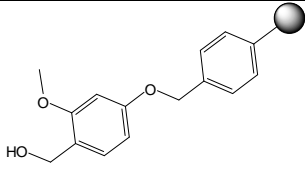
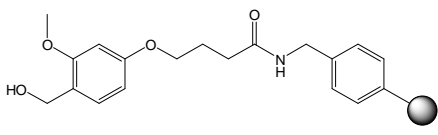
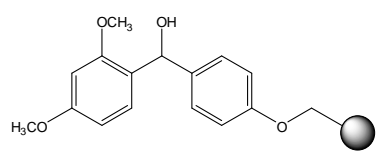
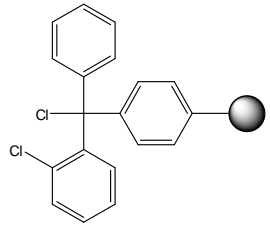
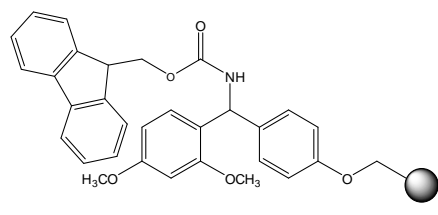
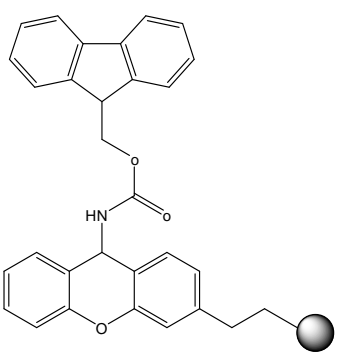


**Figure 43** : Les différents types de support. Tentagel (gauche) et PEGA (droite)

Le choix des résines sera différent selon la stratégie de synthèse utilisée (Fmoc/tBu ou Boc/Bn). Le tableau 3 représente différentes résines couramment employées en stratégie Fmoc/tBu (stratégie que nous utilisons au laboratoire) et leurs conditions de déprotection. Comme on peut le voir dans le tableau, le type de support conditionne les applications possibles à l'utilisation des résines. Egalement le choix de la résine sera déterminant pour la synthèse de séquence particulière qui peut être longue, hydrophobe, difficile<sup>74</sup>.

Résines	Conditions de déprotection	Support disponible	Applications
<b>Peptide acide</b>			
<p style="text-align: center;">Wang</p> 	95% TFA	Polystyrène	Synthèse de peptides acides
		ChemMatrix <sup>®</sup>	Tests sur résine.
<b>Peptide acide protégé</b>			
Sasrin	1% TFA/DCM	Polystyrène	Synthèse peptidique classique.

<sup>74</sup> G. A. Cremer, H. Tariq, A. Delmas. « Combining a Polar Resin and a Pseudo-proline to Optimize the Solid-phase Synthesis of a Difficult Sequence. » *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 437-442.

			
<b>HMPB (4-hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutyric acid)</b> 	1% TFA/DCM	Polystyrène	Synthèse de peptides acides protégés.
<b>Rink Acid</b> 	10% AcOH/DCM	Polystyrène	Synthèse de peptides acides protégés avec des temps de couplage court et de bons rendements.
<b>2-Chlorotrityl chloride</b> 	0.5 % TFA/DCM AcOH/DCM/TFE	Polystyrène	Idéal pour préparation de séquence contenant des Cys, His, Met, Pro et Tyr en C-terminal car pas d'activation lors du premier couplage.
<b>Peptide Amide</b>			
<b>Rink Amide</b> 	95% TFA	Polystyrène	Peptide amide
		PEGA	Tests sur résine et séquence difficile
		Tentagel	Synthèse de longs peptides
<b>Peptide amide protégé</b>			
<b>Sieber Amide</b> 	1% TFA	Polystyrène	Peptide amide protégé
		NovaSyn® TG (PEG-Polystyrène)	Séquence difficile

**Tableau 2 :** Résine et conditions de déprotections. Support disponible et applications possibles de ces types de résines.

Maintenant que nous avons vu le principe de la SPPS, on va s'intéresser à la description et à la synthèse des différents synthons peptidiques nécessaire à notre première approche combinatoire.

### 3. Le châssis peptidique RAFT :

Le cyclodécapeptide RAFT sera utilisé comme support pour assembler de manière combinatoire nos divers synthons.

#### 3.1 Travaux antérieurs :

De nombreux phénomènes biologiques tels que la catalyse ou la reconnaissance moléculaire sont contrôlés par la structure tridimensionnelle des protéines. L'apparition récurrente de motifs structuraux de types hélices  $\alpha$ , coudes ou feuilletts  $\beta$  a contribué à ce que ces éléments soient utilisés comme pièces principales pour l'assemblage d'architectures réduites capables de mimer les protéines (*protein de novo design*<sup>75</sup>). Dans ce contexte, l'utilisation de matrices ou gabarits (« template »), sur lesquels ces éléments sont greffés et peuvent se stabiliser mutuellement, représente une approche élégante pour obtenir des molécules nouvelles ressemblant aux protéines<sup>76</sup>. En particulier, ce principe a été développé par le groupe de Manfred Mutter<sup>77</sup> sous l'acronyme de TASP (« Template Assembled Synthetic Protein »). Dans cette approche, les motifs structuraux ne sont plus reliés linéairement entre eux par leur séquence peptidique comme dans les protéines, mais indépendamment au travers de liens avec la matrice. Ainsi, une meilleure stabilisation entre les motifs est obtenue par coopération intramoléculaire, ce qui permet de s'affranchir des problèmes liés aux repliements des protéines.

#### 3.2 Travaux du laboratoire :

La conception et la synthèse de biomolécules multivalentes présente de nombreux intérêts biologiques comme nous le verrons par la suite. Au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser des gabarits peptidiques, sur le modèle décrit par M. Mutter, comme système répartiteur de fonction pour assembler de manière multivalente des biomolécules de différente nature. Notre approche repose sur la fonctionnalisation régiosélective de ces peptides cycliques comme support pour l'assemblage organisé et contrôlé de différents éléments (RAFT :

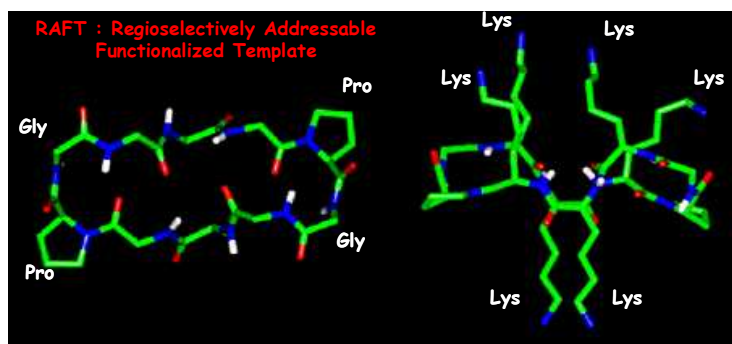
---

<sup>75</sup> a) G. Tuscherer, P. Dumy, M. Mutter. « Protein de Novo Design. » *Chimia*, **1996**, *50*, 644-648; b) P. Dumy. « Cyclic Peptides as Topological Templates in Biomimetic Chemistry. » *Chimia* **1996**, *50*, 640-641.

<sup>76</sup> J. P. Schneider, J. W. Kelly. « Templates that Induce  $\alpha$ -helical,  $\beta$ -sheet, and Loop Conformations. » *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2169-2187.

<sup>77</sup> M. Mutter, S. Vuilleumier. « A Chemical Approach to Protein Design. Template Assembled Synthetic Protein (TASP). » *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1989**, *28*, 535-554.

« Regioselectively Addressable Functionalised Template » ou Matrices Fonctionnalisées Dérivables Régioselectivement)<sup>78</sup>. Ces matrices sont des cyclodécapeptides (figure 44)<sup>79</sup> composés d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle encadré par deux coudes Pro-Gly qui stabilisent leur conformation en solution. Les six autres acides aminés (généralement des lysines) présente leur chaîne latérale de part et d'autre du plan moyen du cycle (quatre vers la face supérieure, deux vers la face inférieure).



**Figure 44 :** Structure tridimensionnelle des RAFT mettant en valeur les sites d'attachement en dessous et en dessus du feuillet.

Elles constituent donc six sites potentiels d'attachement sur deux faces d'adressages topologiquement indépendantes. L'utilisation de ces lysines comme point d'ancrage des éléments à assembler permet de bénéficier de nombreuses protections orthogonales connues pour les fonctions amines (Fig. 45). Des ligands (peptides ou oligosaccharides)<sup>80</sup> seront greffés sur la face supérieure (dite « de reconnaissance »), constituant ainsi une surface de présentation multivalente qui permet d'exalter les propriétés de reconnaissance de nos molécules. Sur la face dite « effectrice » seront accrochés des éléments permettant la détection (fluorophore)<sup>81</sup>, le ciblage (peptide, oligonucéotide)<sup>82</sup> ou l'accrochage sur une surface.

<sup>78</sup> P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter. « A Convenient Synthesis of Cyclic Peptides as Regioselectively Addressable Functionalised Templates (RAFT). » *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.

<sup>79</sup> a) P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter. « Solution Structure of Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT): NMR and Restrained Molecular Dynamics Investigation. » *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308; b) S. Peluso, T. Ruckle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma. « Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. » *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432-437; c) P. Dumy, M.-C. Favrot, D. Boturyn, J.-L. Coll. Brevet PCT/FR03/02773.

<sup>80</sup> a) 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**, *126*, 5730-5739; b) O. Renaudet, P. Dumy. « Chemoselectively Template-assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates. » *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243-246.

<sup>81</sup> O. Renaudet, P. Dumy. « Synthesis of Multitopic Neoglycopeptides Displaying Recognition and Detection Motifs. » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3619-3622.

<sup>82</sup> Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy. « Preparation of a Multitopic Glycopeptide-oligonucleotide Conjugate. » *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.



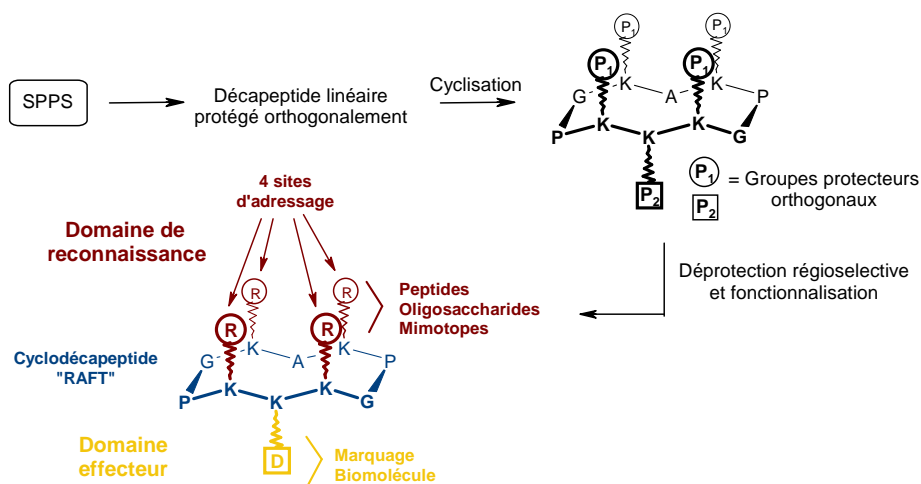


Figure 45 : Structure et stratégie de synthèse des ligands.

Depuis plusieurs années, le laboratoire développe des méthodologies de synthèse<sup>83</sup> qui offrent une capacité de fonctionnalisation modulable de ces systèmes pour des applications biologiques variées. Nous donnerons par la suite quelques exemples de l'utilité de ces systèmes pour la vectorisation tumorale, le développement de vaccins synthétiques ou de modèles de fibres amyloïdes.<sup>84</sup>

### 3.3.1 Vectorisation tumorale :

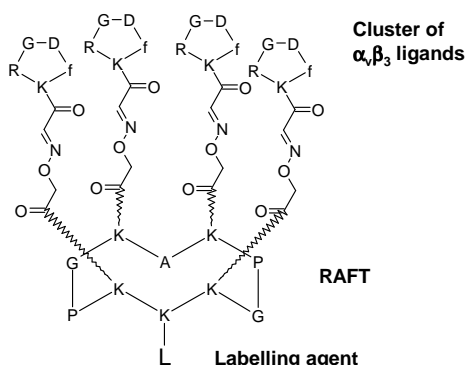
Il a été montré au laboratoire que le ciblage des récepteurs intégrines  $\alpha_v\beta_3$  présents à la surface des cellules tumorales responsables de la néoangiogénèse (vascularisation responsable de la croissance des tumeurs) peut être réalisé en greffant sur le châssis RAFT un cyclopentapeptide comportant la séquence spécifiquement reconnue par ce type d'intégrines : c[-RGDfK-]. L'assemblage chimiosélectif du cyclopentapeptide sur le RAFT conduit à une molécule multivalente (Fig. 46) qui est bien mieux reconnue que le c[-RGDfK-] seul<sup>85</sup>. Sur l'autre face (inférieure) du châssis peuvent être greffés des éléments de détection tels que la cyanine 5. Une fois le ciblage validé des molécules cytotoxiques peuvent être greffées telles que la doxorubicine, la chaîne A de la ricine ou des peptides apoptogènes (KLAKLAK)<sub>2</sub> afin

<sup>83</sup> a) O. Renaudet, P. Dumy. « On-bead Synthesis and Binding Assay of Chemoselectively Template-assembled Multivalent Neoglycopeptides. » *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2628-2636; b) E. Garanger, D. Boturny, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy. « Chemoselectively Addressable Template: A Valuable Tool for the Engineering of Molecular Conjugates. » *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 2402-2410.

<sup>84</sup> a) Y. Singh, G. T. Dolphin, J. Razkin, P. Dumy. « Synthetic Peptide Templates for Molecular Recognition: Recent Advances and Applications. » *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298-1314; b) D. Boturny, E. Defrancq, G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Labbe, O. Renaudet, P. Dumy. « RAFT Nano-constructs: Surfing to biological applications. » *J. Pep. Res.* **2007**, sous presse.

<sup>85</sup> a) E. Garanger, D. Boturny, J-L. Coll, M. C. Favrot, P. Dumy. « Multivalent RGD Synthetic Peptides as Potent  $\alpha_v\beta_3$  integrin ligands. » *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1958-1965; b) J. Razkin, V. Jossierand, D. Boturny, Z. H. Zing, P. Dumy, M. favrot, J-L. Coll, I. Texier. « Activatable Fluorescent Probes for Tumour-targeting Imaging in Live Mice. » *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.

de détruire les cellules ciblées<sup>86</sup>. Des essais sur le petit animal sont en cours et sont très concluants<sup>87</sup>.



**Figure 46 :** RAFT présentant 4 motifs RGD sur la face de reconnaissance et un motif de détection L sur la face effectrice.

### 3.3.2 Vaccins synthétiques :

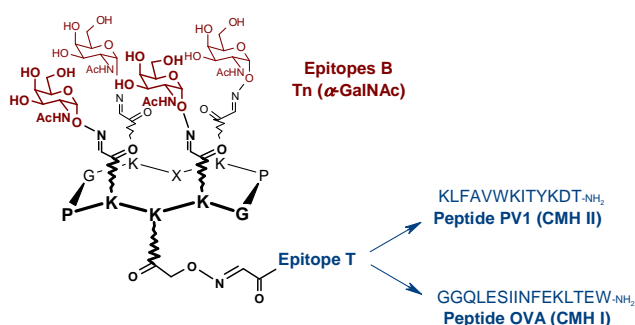
Des molécules hybrides combinant des sucres marqueurs de tumeurs faiblement immunogènes comme le motif Tn (ou  $\alpha$ GalNAc, épitope B-dépendant) et un peptide PV1 aux propriétés antigéniques reconnues (fragment du poliovirus, épitope T-dépendant) permettent de stimuler la réponse du système immunitaire contre les cellules cancéreuses<sup>88,89</sup> (antigène Tn surexprimés a la surface des cellules tumorales des cancers du sein et de la prostate). O. Renaudet *et coll.* ont utilisé la plate-forme RAFT pour réaliser des assemblages comprenant 4 motifs GalNAc et un ou deux peptides PV1 (figure 47) en utilisant la méthode de formation successive de liens oximes. Les études immunologiques *in vivo* effectuées à l'Institut Pasteur (coll. Equipe C. Leclerc, INSERM E0352, Paris) ont montré que l'immunisation de souris par la molécule (PV1)<sub>1</sub>RAFT( $\alpha$ GalNAc)<sub>4</sub> permet d'induire la production d'anticorps spécifiques par un mécanisme de présentation du peptide PV1 par le CMH II aux récepteurs CD4<sup>+</sup> des lymphocytes T auxiliaires naïfs. Ces anticorps sont capables de reconnaître les formes natives d'épitopes Tn exprimés sur les cellules cancéreuses humaines.

<sup>86</sup> E. Garanger, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. C. Favrot, J. L. Coll. «New Multifunctional Molecular Conjugate Vector for Targeting, Imaging and Therapy of Tumors. » *Mol. Therapy* **2005**, *12*, 1168-1175.

<sup>87</sup> Z. Jin, V. Jossierand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M. C. Favrot, J. L. Coll. «In vivo Optical Imaging of Integrin alpha-V beta3 in Mice Using Multivalent or Monovalent cRGD Vectors. » *Mol. Cancer* **2007**, *6*, 41-49.

<sup>88</sup> M. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Deuriaut, C. Leclerc, P. Dumy. « Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. » *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1149-1159.

<sup>89</sup> O. Renaudet, P. Dumy. « Chemoselectively Template-assembled Glycopeptide Presenting Clustered Cancer Related T-antigen. » *Tetrahedron. Lett.* **2004**, *45*, 65-68.



**Figure 47 :** Assemblage d'épitopes et de motifs de reconnaissance sur RAFT.

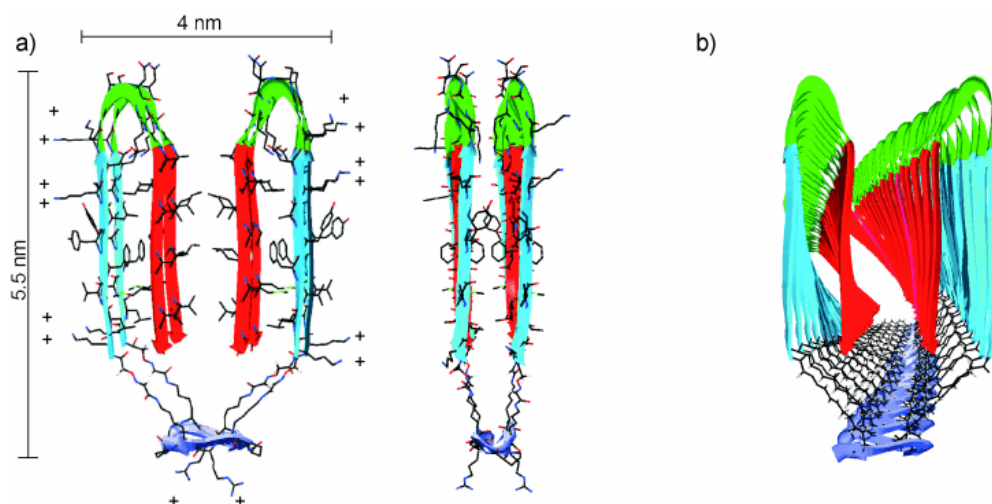
Un second type de molécule hybride où le peptide antigénique a été remplacé par un fragment de l'ovalbumine (OVA, peptide CMH I) a été synthétisé. Les essais *in vitro* ont montré que le composé  $(OVA)_1\text{RAFT}(\alpha\text{GalNAc})_4$  permet d'adresser le peptide OVA vers la présentation CMH de classe 1 en ciblant un récepteur du GalNAc sur les cellules dendritiques, puis de stimuler les lymphocytes T  $\text{CD8}^+$ . Cette deuxième étude semble confirmer le potentiel de ce type de construction moléculaire comme candidat vaccin anticancéreux par l'intermédiaire de deux mécanismes d'activation différents ( $\text{CMH I}/\text{CD8}^+$  et  $\text{CMH II}/\text{CD4}^+$ ). Des résultats plus récents portant sur le design et l'évaluation de candidats vaccins composés de cluster de l'antigène Tn, d'un peptide chimère  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  et d'un motif palmitique ont ouvert de nouvelles perspectives pour la vectorisation tumorale humaine<sup>90</sup>.

### 3.3.3 Modèles de fibres amyloïdes :

L'agrégation de fibres amyloïdes qui sont constitués essentiellement des parties 1-40 et 1-42 du peptide  $\text{A}\beta$  est la caractéristique de la maladie neurodégénérative d'Alzheimer. Pour trouver des stratégies thérapeutiques, la connaissance du mécanisme de formation des fibres ainsi que leur structures sont des éléments indispensables. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des modèles capables de mimer les fibres présentes dans le cerveau lors de la maladie d'Alzheimer. Au laboratoire un modèle parfaitement caractérisé a été conçu par G. Dolphin et coll.<sup>91</sup> Pour cela le peptide  $\text{A}\beta(16-37)$  a été attaché 4 fois sur le châssis moléculaire de type RAFT. Quelques modifications ont été réalisées sur le châssis ainsi que sur le peptide  $\text{A}\beta$  afin de rendre la molécule finale soluble (Fig. 48).

<sup>90</sup> O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy. « Towards Self-Adjuvanting Multivalent B and T cell Epitopes Synthetic Glyco-Lipopeptide Cancer Vaccine. » *ChemMedChem*, **2008**, sous presse.

<sup>91</sup> G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Dumy. « Control of Amyloid Beta-peptide Protofibril Formation by a Designed Template Assembly. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 2699-2702.

Figure 48 : RAFT (Aβ 16-37)<sub>4</sub>.

Le modèle a été caractérisé par dichroïsme circulaire et par microscopie électronique à transmission.

### 3.4 Synthèses du gabarit RAFT :

La matrice cyclodécapeptidique de base est obtenue par cyclisation à partir du peptide linéaire assemblé par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie Fmoc/*t*Bu.

#### 3.4.1 Synthèse du peptide linéaire :

L'élargissement se déroule de manière classique de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale et débute le plus souvent par un résidu glycine. Ce dernier permet en effet d'éviter les problèmes de racémisation qui pourraient se produire lors de l'étape de cyclisation. Le décapeptide linéaire **1** est assemblé sur la résine Gly-Sasrin<sup>®</sup>, résine acido-sensible, par synthèse manuelle en utilisant une stratégie Fmoc/*t*Bu (Schéma 2). La résine est tout d'abord gonflée, à l'aide de DCM et de DMF, pour que les sites de fixation du premier acide aminé soient accessibles.

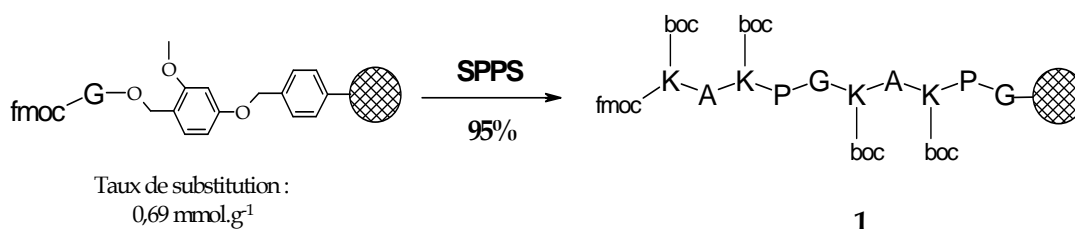


Schéma 2 : Synthèse du décapeptide linéaire 1.

La synthèse est ensuite réalisée en effectuant par une succession de cycles de déprotections et de couplages classiques en SPPS. Le groupe protecteur N- $\alpha$  Fmoc terminal est éliminé par traitement de la résine avec une solution de pipéridine à 20% dans du DMF. La mesure de l'absorbance en UV de l'adduit dibenzofulvènepipéridine à 299 nm, produit lors de cette déprotection, permet d'évaluer le taux de substitution du peptide au cours de la synthèse. D'autre part, les couplages peptidiques sont réalisés en utilisant deux équivalents d'acide aminé et deux équivalents de PyBOP<sup>®</sup> comme réactif de couplage, par rapport au taux de substitution de la résine. On ajoute ensuite 3 à 4 équivalents de DIEA comme base et la réaction s'effectue pendant 30 minutes à pH 8-9 dans du DMF préalablement dégazé. Après chaque couplage, la résine est lavée plusieurs fois avec du DMF puis du DCM puis on évalue si la réaction s'est effectuée de manière quantitative à l'aide de tests colorimétriques, de Kaiser<sup>73</sup> ou du TNBS<sup>72</sup>, réalisés sur quelques grains de résine.

### 3.4.2 Cyclisation :

Après déprotection du dernier groupement Fmoc terminal, le peptide linéaire est décroché de la résine en traitant celle-ci de manière répétée avec une solution de TFA à 1% dans le DCM. L'apparition d'une coloration violette de la résine correspond à la formation du carBocation formé sur la résine lors de la libération du peptide. Un grand soin est apporté lors de l'évaporation sous pression réduite à froid des solutions de coupure, afin d'éviter toute perte prématurée des groupements N- $\epsilon$  Boc, ce poserait des problèmes de réactions parasites lors de l'étape de cyclisation. Le produit est ensuite obtenu sous la forme d'une poudre blanche après précipitation et lavages à l'éther.

La réaction de cyclisation est réalisée dans du DMF ou DCM sous conditions de haute dilution ( $0,5 \cdot 10^{-3}$  M) en utilisant un équivalent de PyBOP<sup>®</sup> comme réactif de couplage et en présence de DIEA comme base (Schéma 3). Nous pouvons noter qu'aucune réaction intermoléculaire n'est observée : ceci pourrait être expliqué par la conformation quasi-cyclique adoptée par le peptide linéaire, induite par les deux coudes  $\beta$ . Après une heure de réaction à température ambiante, la cyclisation est complète. Le peptide **3** est obtenu après précipitation et lavages à l'éther. Il est obtenu sans plus de purification avec un rendement de 96%. Ces gabarits cycliques sont obtenus avec de très bons rendements après précipitation à l'éther<sup>92</sup> et dans des quantités de l'ordre du gramme.

---

<sup>92</sup> E. Crusi, J. M. Huerta, D. Andreu, E. Giralt. « GLY/LYS-containing Peptide Macrocycles : Synthesis and Cyclisation Studies. » *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4191-4194.

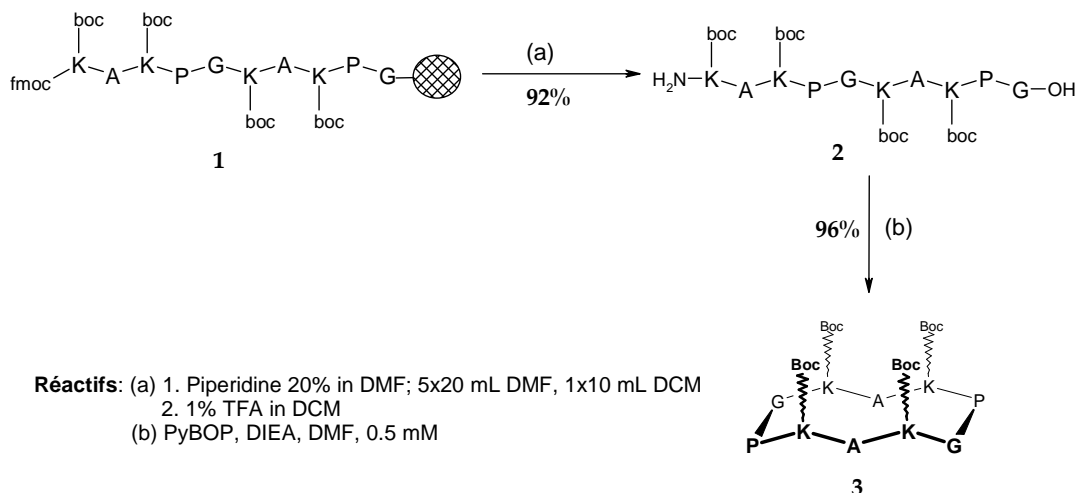


Schéma 3 : Cyclisation du châssis.

### 3.4.3 Incorporation des résidus sérine :

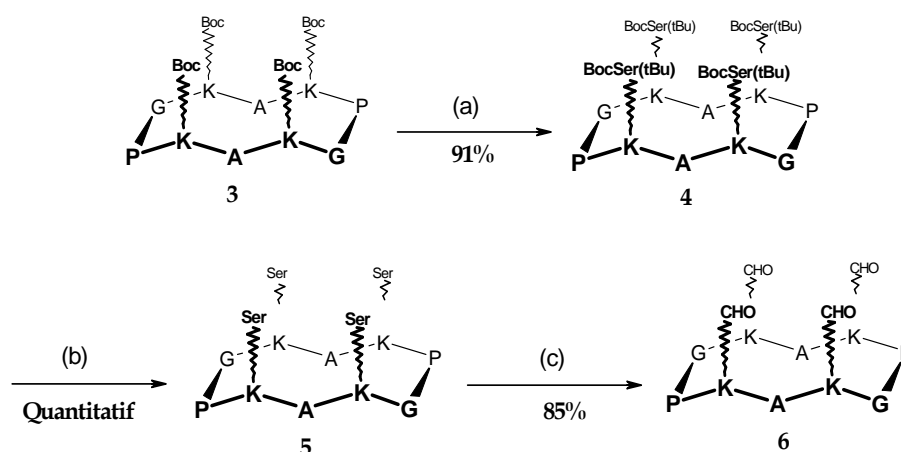
Les groupements N-ε Boc sont éliminés par acidolyse au TFA<sup>93</sup> pendant 30 minutes à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec et le peptide est précipité à l'éther et obtenu sous la forme de sels de TFA puis utilisé sans autre purification. L'incorporation des résidus Boc-Ser(-OtBu) sur les chaînes latérales des lysines s'effectue selon une procédure classique de couplage peptidique en solution (1 équivalent d'acide aminé protégé et 1 équivalent de PyBOP par site de réaction ; 3 à 4 équivalents de DIEA comme base, dans du DMF préalablement dégazé à une concentration de 10<sup>-2</sup> M). La réaction est suivie par CLHP analytique. Après 30 minutes de réaction, nous observons la disparition du réactif de départ au profit des différents intermédiaires réactionnels possédant un à quatre résidus Boc-Ser(-OtBu). La réaction est totale après 1 heure et après précipitation et lavage à l'éther, le composé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche. Sa pureté est alors contrôlée par CLHP analytique, puis il est placé dans 95% de TFA et des leurres de carBocations (scavengers) pendant 30 minutes à température ambiante pour effectuer la déprotection des groupements -Boc et -tBu. Les scavengers sont nécessaires pour piéger les carBocations formés lors des déprotections des Boc et tBu qui pourraient réagir de nouveau avec les fonctions nucléophiles des sérines déprotégées. La matrice **5**, possédant quatre résidus sérine libres, est obtenue avec un rendement de 91%.

### 3.4.4 Oxydation :

Notre méthodologie suppose d'introduire au préalable, au niveau des quatre sites d'adressage

<sup>93</sup> G. W. Anderson, A. C. McGregor. « t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. » *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 6180-6183.

de la face supérieur, une fonction aldéhyde complémentaires des fonctions oxyamines des partenaires sucres ou peptides. Les méthodes pour générer des aldéhydes sont bien documentées<sup>94</sup>. L'une d'entre elles requiert l'utilisation de sérines protégées comme équivalents masqués d'aldéhyde<sup>95</sup>. Après déprotection et coupure oxydative des fonctions 1,2-aminoéthanol, l'aldéhyde glyoxylique obtenu (RAFT-aldéhyde) est extrêmement réactifs en présence de fonctions oxyamines et conduit à la formation de liaisons éthers d'oximes glyoxyliques artificielles particulièrement stables. Cette réaction est effectuée en présence de 10 équivalents de périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) par site de réaction dans de l'eau millipore à une concentration de  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  (Schéma 4). La réaction est laissée à température ambiante sur une durée maximale de 1 heure pour éviter les problèmes de suroxydation. L'aldéhyde glyoxylique **6** est obtenu avec un rendement de 85% après purification par CLHP semi-préparative pour éliminer les sels d'iode résiduels et le formaldéhyde formé lors de la réaction. Le rendement global sur l'ensemble de la synthèse est de 64% à partir du peptide linéaire.



**Réactifs:** (a) 1. TFA 50% inDCM;  
2. Boc-Ser(tBu)-OH, PyBOP, DIEA, DMF  
(b) TFA/TIS/ $\text{H}_2\text{O}$  (95/2.5/2.5)  
(c)  $\text{NaIO}_4$ , 10eq / site sérine,  $\text{H}_2\text{O}$

**Schéma 4 :** Incorporation des résidus sérine et Formation des aldéhydes glyoxyliques.

#### 4. Synthèses des ligands peptidiques oxyamines :

Comme nous venons de l'évoquer, les fonctions aldéhydes du RAFT sont dédiées à l'accrochage chimiosélectif de ligands qui seront pourvus de fonctions oxyamines.

<sup>94</sup> O. Melnyk, J-A. Fehrentz, J. Martinez, H. Gras-Masse. « Functionalization of Peptides and Proteins by Aldehyde or Keto groups. » *Pept. Science* **2000**, 55, 165-170.

<sup>95</sup> K. F. Geoghegan, J.G. Stroh. « Self-directed Conjugation of Nonpeptide Groups to Peptides and Protein via Periodate Oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. » *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138-146.

#### 4.1 Synthèse de peptides modèles :

Dans le but d'étudier les conditions opératoires qui assureront l'efficacité de notre méthode d'assemblage combinatoire, nous avons tout d'abord préparé des peptides modèles fonctionnalisés par une oxyamine.

##### 4.1.1 Synthèse des peptides et protection de la fonction oxyamine par un groupement Boc :

Les quatre peptides linéaires décrits ci-après ont été synthétisés par SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu, puis fonctionnalisés par une oxyamine sur leur extrémité N-terminale. Ils présentent tous le même résidu glycine fonctionnalisé par une oxyamine en fin de chaîne pour garantir des réactivités identiques au moment de la formation du lien éther d'oxime lors de la synthèse des différentes bibliothèques. En effet, la glycine sert de « linker » en éloignant la fonction oxyamine du peptide, prévenant ainsi les risques de répulsions stériques. On peut ainsi obtenir des mélanges de produits non biaisés, ne favorisant pas une séquence par rapport à une autre. Enfin, ces séquences ont été choisies pour avoir des longueurs et des masses différentes impliquant par ailleurs que les temps de rétention de chaque peptide sont différents, ce qui facilitera par la suite la caractérisation des produits formés au sein des bibliothèques aussi bien par CLHP que par spectrométrie de masse (Fig. 49).

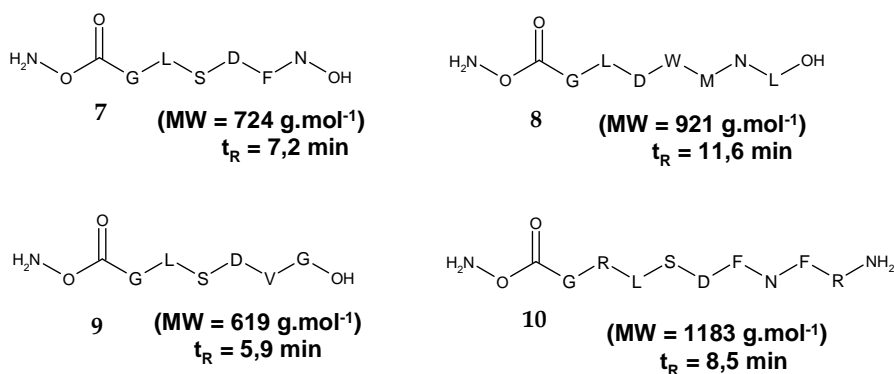
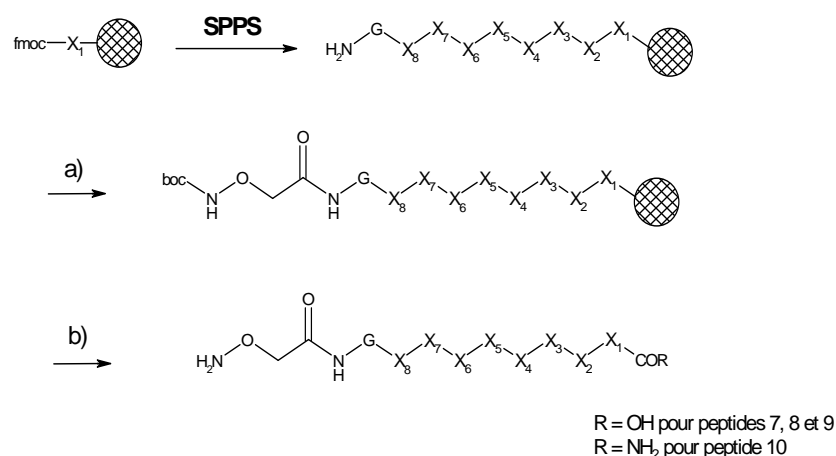


Figure 49 : Peptides utilisés pour la mise au point.

Les séquences **7**, **8** et **9** ont été assemblées sur la résine 2-chlorotriptyle<sup>®</sup> et la séquence **10** sur la Sieber Amide selon la procédure décrite pour le peptide linéaire du RAFT (Schéma 5).



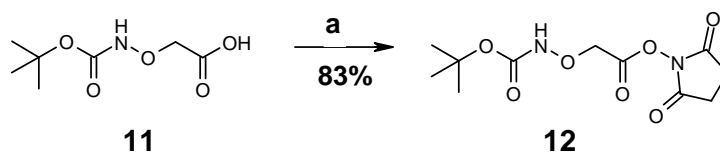


Réactifs: a) 1eq. Boc-AOA-OSu, 1eq. DIEA, DMF, 45 min  
b) TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5), 2h

Schéma 5 : Schéma global de synthèse peptides 7 à 10.

Au laboratoire le précurseur d'oxyamine utilisé depuis plusieurs années est l'ester activé de l'acide *N*-Boc aminoxyacétique (Boc-Aoa-OH) **11**. Ce composé se prépare très facilement avec un bon rendement en une seule étape. L'acide aminoxyacétique commercial protégé par un Boc est activé en utilisant le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et du DCC dans un mélange acétate d'éthyle et de dioxane. Après élimination de la DCU par filtration le produit **12** (Boc-Aoa-OSu) est obtenu sous forme de précipité blanc avec 83% de rendement (Schéma 6).

La fonctionnalisation *N*-terminale de ces quatre peptides s'effectue, après déprotection du groupement Fmoc terminal, en présence d'un équivalent du dérivé **12** et de 1 équivalent de DIEA comme base pour se placer à pH 8-9. La réaction s'effectue dans du DMF préalablement dégazé à une concentration de 10<sup>-2</sup> M durant 45 minutes à température ambiante (Schéma 5).

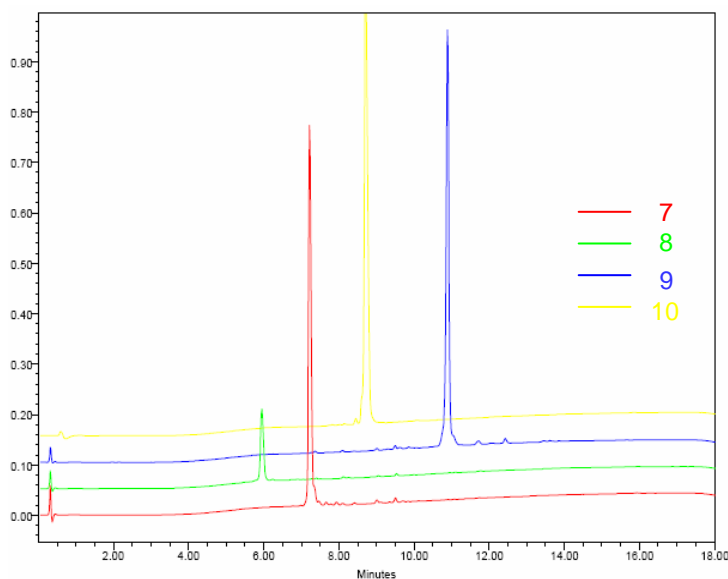


Réactifs: (a) DCC, NHS, AcOEt/Dioxan 0,4M;

Schéma 6 : Synthèse de Boc-Aoa-OSu.

Les peptides sont ensuite décrochés de la résine et déprotégés sur leurs chaînes latérales par traitement répété à l'acide avec une solution à 95% de TFA et des piègeurs de carbocations appropriés. Après précipitation et lavages à l'éther puis purifications par CLHP semi-préparative, les produits furent caractérisés par spectrométrie de masse et analysés par CLHP

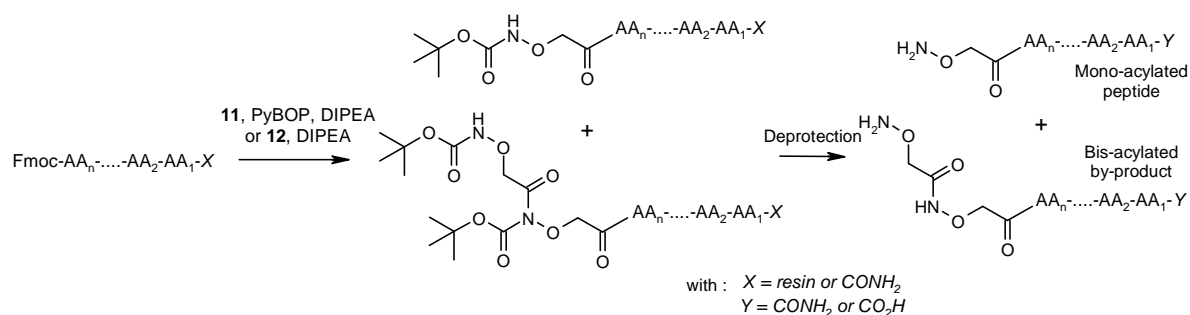
analytiques (Fig. 50). Ils sont obtenus sous forme de poudres blanches avec des rendements globaux de 58% à 78%.



**Figure 50 :** Profil CLHP analytique observé à 214 nm des quatre séquences (gradient de 5 à 60 % de B en 15 minutes).

Lors de cette synthèse, nous avons constaté que les peptides **7** et **8** furent obtenus en présence de produits secondaires présentant deux motifs oxyamines. Ce phénomène de « N-overacylation » sur la fonction oxyamine est un problème récurrent dans ce type de couplage<sup>96</sup>. En effet, l'atome d'azote étant mono-protégé, il possède des propriétés nucléophiles qui rend l'attaque sur l'ester activé possible. Ce problème est généralement observé lors des couplages utilisant le PyBOP (nécessite une base) mais également à un degré moindre avec les esters activés. De plus, les conditions opératoires de synthèse peptidique sur phase solide impliquent l'utilisation de réactifs en excès par rapport au peptide en élévation sur la résine. Pour des raisons d'encombrement stérique, cette dernière fonctionnalisation est laborieuse et doit souvent être répétée. Il est donc possible que dans notre cas, certains motifs oxyamines aient été greffés deux fois sur la même séquence peptidique (Fig. 51), conduisant à un produit secondaire bis-acylé.

<sup>96</sup> J. Brask, K. J. Jensen. « Carbopeptides: Chemoselective Ligation of Peptide Aldehydes to an Aminoxy-functionalized D-Galactose Template. » *J. Pept. Sci.* **2000**, 6, 290-299.



**Figure 51** : Fonctionnalisation des peptides par les produits 11 ou 12 et formation du produit bis-acylé.

Quelques méthodes ont été reportées pour minimiser, voire empêcher cette bis-acylation<sup>97</sup>. Il a été notamment montré récemment que la N-bis-acylation peut être réduite en contrôlant le pH de la réaction mettent en jeu l'Aloc-Aoa-OH, en utilisant une base encombrée (collidine) et un agent de couplage (type uronium) ou avec du DCC (ne nécessite pas de base pour être active). Cependant même si les résultats obtenus sont convaincants, les réactions ne sont pas toujours totales même en utilisant un large excès de réactifs ou en réalisant des doubles couplages. Une autre alternative consiste à incorporer une double protection de l'azote : Boc<sub>2</sub>-Aoa-OH. Malheureusement, ce composé n'est pas stable dans les conditions de déprotection du Fmoc ce qui limite son utilisation pour la synthèse peptidique<sup>98</sup>. Nous avons donc étudié une nouvelle méthode pour introduire la fonction oxyamine qui permet de prévenir ce type de réaction secondaire<sup>99</sup>. Notre méthode de chimie combinatoire nécessite en effet de travailler avec des produits purs ne contenant pas de produit bis-acylé pour éviter tout risque de formation de produits parasites qui pourraient compliquer l'analyse des chromatogrammes CLHP.

#### 4.1.2 Protection de la fonction oxyamine par un groupement Éthoxyéthylidène :

Nous proposons que le groupe éthoxyéthylidène (Eei) pourrait se révéler intéressant pour protéger efficacement la fonction oxyamine. Ce groupe assure en effet une protection totale des doublets de l'azote et devrait donc empêcher la bis-acylation.

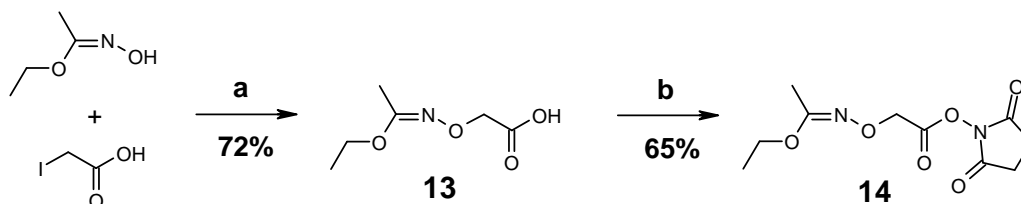
<sup>97</sup> a) P. I. Decostaire, D. Lelièvre, H. Zhang, A. F. Delmas. « Controlling the outcome of overacylation of N-protected aminoxyacetic acid during the synthesis of an aminoxy-peptide for chemical ligation. » *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7057; b) C. Jiménez-Castells, B. G. de la Torre, R. G. Gallego, D. Andreu. « Optimized synthesis of aminoxy-peptides as glycoprobe precursors for surface-based sugar-protein interaction studies. » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5155-5158.

<sup>98</sup> S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturny, P. Dumy. « Preparation of a new building blocks for oxime ligation and their use in peptide synthesis. » *J. Org. Chem.* **2007**, soumis.

<sup>99</sup> V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy. « Ethyl acetimidate protecting group prevents overacylation in solution and solid phase synthesis of aminoxy peptides. » *Tetrahedron* **2007**, sous presse.

#### 4.1.2.1 Synthèse du dérivé Eei-Aoa :

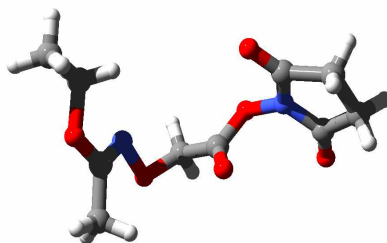
La synthèse débute par la condensation de l'éthyl de N-hydroxyacétimidate sur l'acide iodoacétique dans la soude afin d'obtenir le produit **13** avec un rendement de 72% (Schéma 7). L'étape d'activation par le N-hydroxysuccinimide est identique à celle décrite précédemment et le produit Eei-Aoa-OSu **14** est obtenu après une chromatographie « flash » sur gel de silice et recristallisation dans un mélange dichlorométhane/pentane.



**Réactifs:** (a) NaOH 40%, 80°C, 5h ; (b) DCC, NHS, AcOEt/Dioxan 0,4M

**Schéma 7 :** Synthèse de Eei-Aoa-OSu 14.

Le produit **14** obtenu sous forme de cristaux a ainsi pu être analysé par diffraction aux rayons X (Fig. 52).



**Figure 52 :** Structure au RX de Eei-Aoa-OSu 14.

Ce composé cristallin est facilement obtenu à l'échelle du gramme et présente une très bonne stabilité. On peut ainsi le stocker sous forme cristalline pendant plusieurs mois.

#### 4.1.2.2. Déprotection et stabilité du groupe protecteur Eei

Afin de vérifier la compatibilité de ce groupe protecteur avec les conditions de synthèse peptidique, nous avons étudiés sa stabilité dans différentes conditions utilisées couramment en synthèse peptidique (tableau 3).

Conditions	Deprotection <sup>b</sup>
DIPEA/DMF (pH 8) <sup>a</sup>	No deprotection after 45 min
Piperidine/DMF (1:4) <sup>a</sup>	No deprotection after 30 min
TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:99) <sup>a</sup>	No deprotection after 1 h
AcOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	No deprotection after 3 h
TFA/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (1:49.5:49.5)	Complete deprotection after 3 h
TFA/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (5:47.5:47.5)	Complete deprotection after 1 h
TFA/TIS/H <sub>2</sub> O (95:2.5:2.5)	Complete deprotection after 1 h
AcOH/TFE/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1:8) <sup>a</sup>	No deprotection after 2 h

<sup>a</sup> Dry solvents were used.

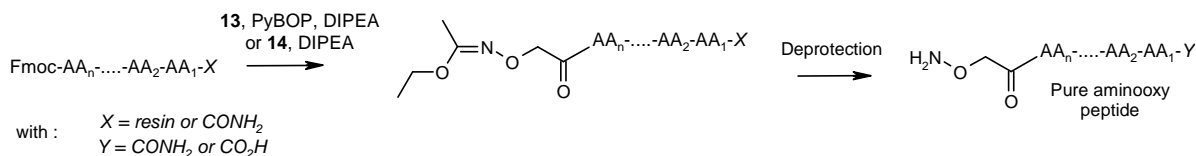
<sup>b</sup> The stability of Eei was followed by analytical RP-HPLC of reaction mixture.

**Tableau 3 :** Stabilité du groupe Eei dans différentes conditions opératoires.

La stabilité du groupe est suivie par CLHP analytique du mélange réactionnel. On peut noter qu'il n'y a aucune déprotection dans les conditions basiques de couplage peptidique et de déprotection du Fmoc, ce qui indique sa compatibilité totale avec l'élongation des peptides. Le groupe Eei est stable en condition d'acide douce (1% TFA dans le dichlorométhane ou 50% d'acide acétique dans l'eau) alors qu'il s'hydrolyse en condition aqueuse de 1% ou 5% de TFA dans l'acétonitrile en 3 heures et 1 heure respectivement. Ce résultat suggère une orthogonalité intéressante entre ce groupe protecteur et les groupements Boc et tBu. De plus, le cocktail standard d'élimination de groupes protecteurs TFA/TIS/H<sub>2</sub>O assure la complète hydrolyse du groupe Eei alors qu'avec le cocktail AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> les groupes acido-labiles sont préservés, ce qui suggère que ce groupe protecteur puisse être conservé après élimination d'une résine de type chlorotryl.

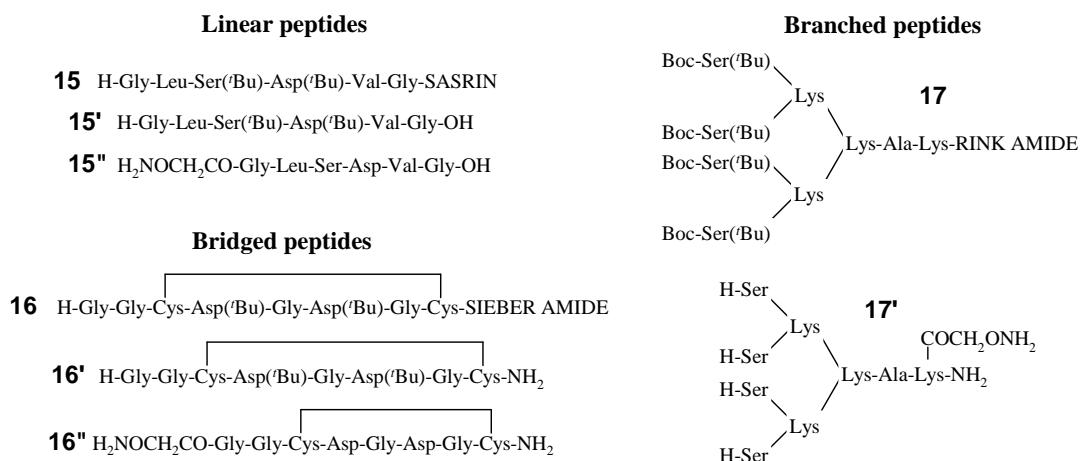
#### 4.1.2.3 Etude comparative entre Boc-Aoa-R et Eei-Aoa-R

Nous avons donc étudiés et comparé l'incorporation de l'acide aminoxyacétique protégé par Boc ou Eei sur différents peptides en faisant varier les conditions de couplage et les réactifs<sup>99</sup>. Nous avons choisi des peptides linéaires, cycliques et polybranchés afin d'avoir une diversité structurale et stérique assez large. La fonctionnalisation des peptides sera réalisée en présence des composés **12** et **14** soit en présence des composés **11** et **13** et de PyBOP<sup>®</sup>. Ces couplages sont réalisés sur support et en solution (Fig. 53).



**Figure 53 :** Stratégie de fonctionnalisation des peptides avec l'oxyamine en solution ou sur support solide.

Les peptides linéaires et cycliques seront fonctionnalisés sur la position N-terminale alors que le peptide poly-branché sera lui fonctionnalisés sur la chaîne latérale de lysine après une déprotection Alloc (Fig. 54). Ces peptides ont été synthétisés manuellement en utilisant la stratégie classique Fmoc/*t*-Bu. Le peptide cyclique est obtenu après formation du pont disulfure entre les deux cystéines par oxydation à l'iode selon la procédure décrite par Barany<sup>100</sup>.



**Figure 54 :** Peptides utilisés et obtenus lors de l'étude.

#### 4.1.2.3.1 Fonctionnalisation utilisant les dérivés esters activés :

Nous avons d'abord étudié l'acylation des peptides avec les esters activés de nos deux composés. Les couplages (phase solide ou solution) sont réalisés à température ambiante en utilisant 2 équivalents de dérivés R-Aoa-OSu et en présence de DIEA (pH ajusté à 8). Le taux de fonctionnalisation donné dans le tableau suivant est déterminé par intégration des pics du profil CLHP correspondants au produit mono et bis-acylé (Tableau 4). Sur phase solide on peut voir que un équivalent du dérivé Boc-Aoa-OSu **12** ne suffit pas pour convertir complètement le produit de départ (**15**, **16** ou **17**) en produit acylé. Il faut donc rajouter deux équivalents pour obtenir une réaction totale mais avec l'apparition d'une quantité assez

<sup>100</sup> Y. Han, G. Barany. « Novel *S*-Xanthenyl Protecting Groups for Cysteine and Their Applications for the *N*<sup>ε</sup>-9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Strategy of Peptide Synthesis. » *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3841-3848.

importante (9%) de produit bis-acylé pour le peptide **15**. Du à la faible accessibilité de l'amine terminale des peptides **16** et **17**, un cycle avec deux équivalents supplémentaires de Boc-Aoa-OSu **12** est nécessaire pour obtenir les produits **16''** et **17''** contaminés par une quantité croissante de produit bis-acylés. Au contraire l'utilisation d'un excès du dérivé **14** (2 ou 4 équivalents) assure la complète conversion des peptides **15**, **16** ou **17** en leur produit mono acétylé correspondant. Comme attendu, ce dérivé permet la formation de composé **15'**, **16'** et **17'** purs et après déprotection aucune trace de produit de départ ou de bis-acylation n'est détectée en CLHP analytique ou spectrométrie de masse (Fig. 55).

Peptide	Conditions <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> N-peptide		Mono-acylated peptide		Bis-acylated peptide	
		% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>
<b>15</b>	1 eq. of <b>12</b>	20	547.11 (547.27)	80	620.11 (620.29)	0	-
<b>15</b>	2 eq. of <b>12</b>	0	-	91	620.08	9	693.10 (693.31)
<b>15</b>	2 eq. of <b>14</b>	0	-	100	620.08	0	-
<b>16</b>	1 eq. of <b>12</b>	50	792.28 (792.30)	50	965.09 (965.35)	0	-
<b>16</b>	2 eq. of <b>12</b>	41	792.28	55	965.13	4	1138.22 (1138.44)
	+ 2 eq. of <b>12</b>	0	-	88	965.03	12	1138.34
<b>16</b>	2 eq. of <b>14</b>	40	792.23	60	935.08 (935.34)	0	-
	+ 2 eq. of <b>14</b>	0	-	100	934.91	0	-
<b>17</b>	1 eq. of <b>12</b>	d. <sup>d</sup>	949.11 (949.58)	d.	1022.08 (1022.59)	n.d.	1095.2 (1095.61)
<b>17</b>	2 eq. of <b>12</b>	d.	949.02	d.	1022.07	d.	1095.21
	+ 2 eq. of <b>12</b>	n.d. <sup>d</sup>	-	d.	1022.17	d.	1095.31
<b>17</b>	2 eq. of <b>14</b>	d.	949.07	d.	1022.09	n.d.	-
	+ 2 eq. of <b>14</b>	n.d.	-	d.	1022.14	n.d.	-
<b>15'</b>	1 eq. of <b>12</b>	30	547.06	70	620.12	0	-
<b>15'</b>	2 eq. of <b>12</b>	0	-	91	620.08	9	693.12
<b>15'</b>	2 eq. of <b>14</b>	0	-	100	620.12	0	-
<b>16'</b>	1 eq. of <b>12</b>	7	792.34	86	965.36	7	1138.78 (1138.44)
<b>16'</b>	2 eq. of <b>12</b>	0	792.28	80	965.89	20	1138.89
<b>16'</b>	2 eq. of <b>14</b>	0	-	100	934.75 (935.34)	0	-

<sup>a</sup> Reactions were performed in DMF in the presence of DIPEA (2 equivalents, pH 8) for 45 minutes at room temperature.

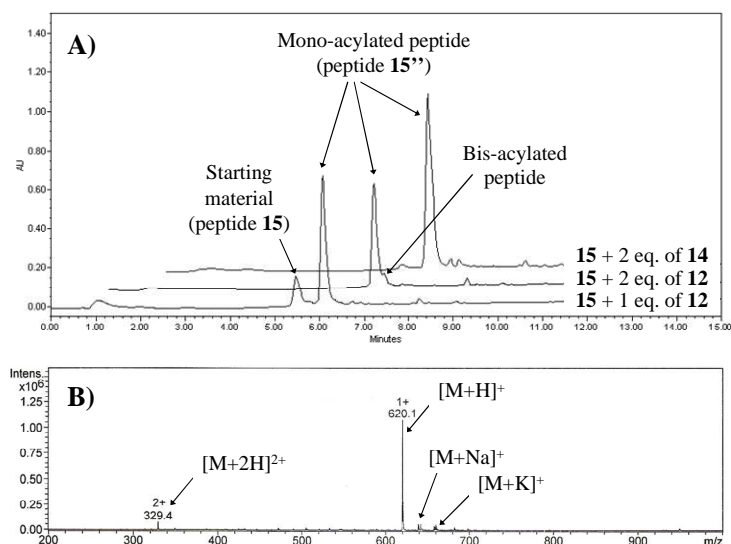
<sup>b</sup> Percentage of each compound is determined by analytical RP-HPLC by the integration of each peak after cleavage (peptides **A**, **B** and **C**) or by analyzing the reaction mixture (peptides **A'** and **B'**).

<sup>c</sup> Mass spectrometry analysis was performed by electrospray ionisation method in positive mode (ESI-MS). The mass found is given for either protected (**B**) or fully deprotected peptides (**A** and **C**). Calculated mass is given into brackets.

<sup>d</sup> The high polarity of both mono- and bis-acylated peptide **C** prevents the identification of the corresponding peaks in our HPLC analysis conditions. Thus, no percentage can be calculated from HPLC profile and only a qualitative result obtained by MS analysis is given as detection (d.) or no detection (n. d.).

**Tableau 4:** Acylation des peptides **15**, **16** et **17** sur support solide et **15'**, **16'** en solution.

Les résultats obtenus en solution avec **15'** et **16'** sont similaires. Même si deux équivalents de Boc-Aoa-OSu **12** sont suffisants pour obtenir une réaction totale, 9% (pour **15'**) et 20% (pour **16'**) de produit non désiré sont obtenus. D'un autre coté les couplages réalisés avec Eei-Aoa-OSu **14** nous donnent les produits attendus **15''** et **16''** quantitativement.



**Figure 55 :** A) Trace CLHP de la fonctionnalisation du peptide **15** avec les dérivés **12** et **14** sur phase solide après déprotection (gradient 5-60 % B en 15 minutes) ; B) Spectre de masse du peptide brut **15''** obtenu de la fonctionnalisation du peptide **15** avec le dérivé **14** sur phase solide après déprotection (ESI).

#### 4.1.2.3.2 Fonctionnalisation utilisant le PyBOP :

Nous avons ensuite étudié l'utilité de groupe protecteur Eei sur phase solide en utilisant un activateur : le PyBOP. Nous réalisons ensuite la même étude que précédemment en comparant le taux de conversion et de bis-acylation entre les deux types de groupes protecteurs (Tableau 5).

Peptide	Conditions <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> N-peptide		Mono-acylated peptide		Bic-acylated peptide	
		% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>
<b>15</b>	1 eq. of <b>11</b>	7	547.10 (547.27)	60	620.08 (620.29)	33	693.07 (693.31)
<b>15</b>	2 eq. of <b>11</b>	0	-	59	620.11	41	693.08
<b>15</b>	2 eq. of <b>13</b>	0	-	100	620.08	0	-

<sup>a</sup> Reactions were performed using 1 or 2 equivalents of PyBOP in DMF in the presence of DIPEA (2 equivalents, pH 8) for 45 minutes at room temperature.

<sup>b</sup> See Table 3.

<sup>c</sup> Mass spectrometry analysis was performed by ESI in positive mode. The mass found is given for fully deprotected peptide. Calculated mass is given into brackets.

**Tableau 5 :** Acylation du peptide **14** sur support solide en utilisant les dérivés **11** et **13** en présence de PyBOP<sup>®</sup>.

On remarque que l'utilisation d'un seul équivalent de Boc-Aoa-OH **11** et de PyBOP conduit à un mélange comprenant le produit de départ, le produit acylé et le produit bis-acylé ce qui limite l'utilisation de ce groupe protecteur en SPPS. Le passage à deux équivalents augmente sensiblement le taux de produit bis-acylé (41%). Par contre comme attendu l'utilisation de deux équivalents de Eei-Aoa-OH **13** conduit au produit attendu de façon très propre. Ces résultats suggèrent que le groupe acide aminoxyacétique peut être incorporé de façon très propre sur support solide ou en solution en utilisant l'éthoxyéthylidène comme groupe



protecteur d'oxyamine. C'est pourquoi nous utilisons dorénavant ce groupe protecteur au laboratoire lorsque l'on souhaite fonctionnaliser des peptides par une oxyamine.

#### 4.2 Synthèse des acides aminés :

Les acides aminés modifiés sont synthétisés afin de les incorporer dans l'assemblage combinatoire avec les sucres oxyamines. Ils sont fonctionnalisés par une oxyamine en position *N*-terminale. Nous avons choisi des acides aminés qui présentent des caractéristiques différentes : d'hydrophobicité, de polarité ou de charge. La réaction se déroule dans du DMF en présence d'un petit excès (1,2 équivalents) de précurseur de fonction oxyamine **14** (Schéma 8).

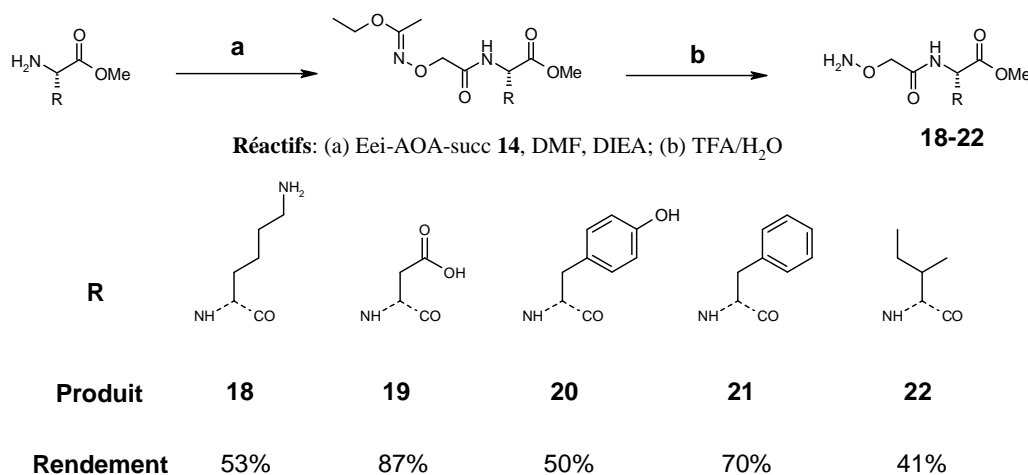


Schéma 8 : Synthèse des acides aminés fonctionnalisés.

Les produits sont purifiés par CLHP semi-préparative après la première étape car à ce stade de la synthèse, ils sont suffisamment apolaires pour qu'on puisse utiliser cette technique. Après déprotection par acidolyse, les acides aminés déprotégés et fonctionnalisés sont obtenus avec des rendements modestes sous forme de poudre blanche (**22**) ou sous forme d'huile (**18-21**).

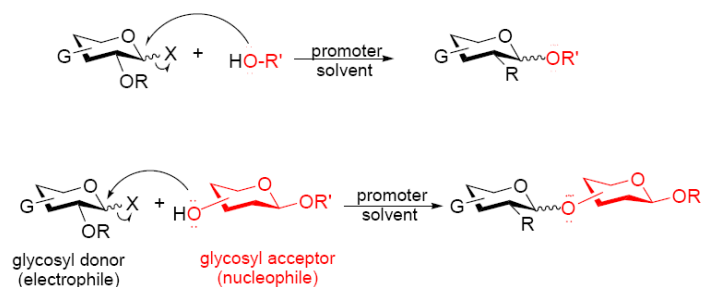
#### 5. Synthèse des ligands saccharidiques :

En comparaison avec les peptides et les acides nucléiques, les synthèses d'oligosaccharides sont beaucoup plus complexes en raison de leur architecture ramifiée, de la diversité des liens glycosidiques rencontrés (configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  à chaque connexion) et de la présence d'un grand nombre de sites de réactivité. Elles nécessitent de nombreuses étapes (protections / déprotections, activations..) qui doivent être adaptées à la complexité des structures, et les purifications sont généralement longues et difficiles. De plus, la réactivité est largement

dépendante de la séquence saccharidique et du type de protection employé. Chaque cas est donc unique et la généralisation d'une méthode de synthèse reste difficilement envisageable. Par conséquent, les conditions opératoires utilisées lors des couplages glycosidiques (température, solvant, promoteur, groupes protecteurs, activateurs) constituent des éléments essentiels à maîtriser pour optimiser les synthèses.

### 5.1 Les couplages glycosidiques :

Il n'existe pas réellement de stratégie classique en chimie des sucres<sup>101</sup>. D'une manière générale, la synthèse d'oligosaccharide s'effectue de l'extrémité réductrice à l'extrémité non réductrice et nécessite un sucre donneur portant un groupe activant en position anomère et un sucre (ou un alcool) accepteur ayant une fonction hydroxyle libre (Fig. 56). La plupart des méthodes de couplage utilisent une approche similaire à celle rapportée par les pionniers W. Koenigs et E. Knorr en 1901<sup>102</sup>. Il s'agit d'induire le départ du groupe activant halogéné du sucre donneur par un acide de Lewis (généralement des sels d'argent ou de mercure) et de le remplacer par une fonction hydroxyle libre du sucre (ou autre) accepteur.



**Figure 56** : Glycosylation par un sucre ou par un hydroxyle.

Plus récemment, le développement de nouvelles méthodes de glycosylation<sup>103</sup> utilisant d'autres groupements activants (Figure 57) comme les trichloroacétimides<sup>104</sup>, les n-pentenyls<sup>105</sup> ou les glycols<sup>106</sup> ont permis de faciliter le contrôle de la stéréochimie de la liaison glycosidique qui constitue la principale difficulté de ces synthèses.

<sup>101</sup> a) H. Paulsen. « Advances in Selective Chemical Syntheses of Complex Oligosaccharides. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, 21, 155-224; R. R. Schmidt. « New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides – Are there alternatives to the Koenigs-Knorr Method ? » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-235; b) G. J. Boons. « Strategies in Oligosaccharide Synthesis. » *Tetrahedron* **1996**, 52, 1095-1121.

<sup>102</sup> W. Koenigs, E. Knorr. *Ber.* **1901**, 34, 957.

<sup>103</sup> K. C. Nicolau, H. J. Mitchell. « Adventures in Carbohydrate Chemistry: New Synthetic Technologies, Chemical Synthesis, Molecular Design, and Chemical Biology. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 1576-1624.

<sup>104</sup> R. R. Schmidt, J. Michel. « Facile Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -O-glycosyl Imidate: Preparation of Glycosides and Disaccharides. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731-732.

<sup>105</sup> B. Freiser-Reid, K. Konradsson, D. Mootoo, U. Udodong. « Direct Elaboration on Pent-4-enyl Glycoside into Disaccharides. » *J. Am. Chem. Soc. Commun.* **1988**, 823-825.

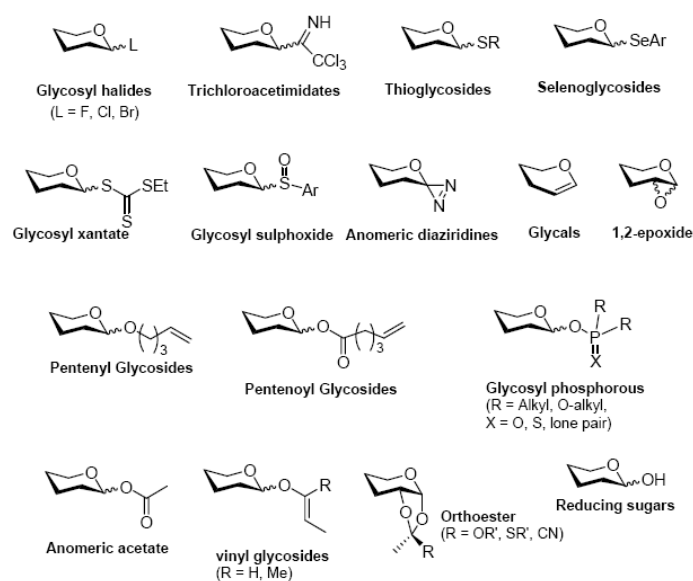


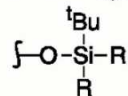
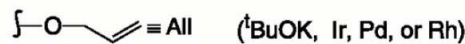
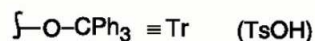
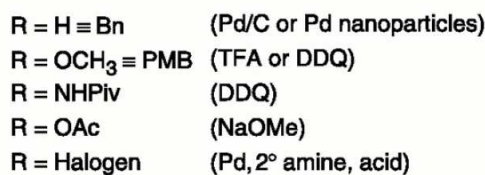
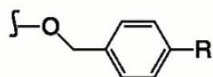
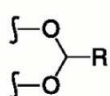
Figure 57 : Sucres donneurs activés classiques.

## 5.2 Contrôle de la stéréochimie :

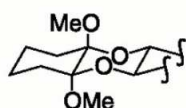
### 5.2.1 Les groupes protecteurs :

Au même titre que la synthèse peptidique, la manipulation de groupes protecteurs orthogonaux est primordiale en chimie des sucres. Elle présente de nombreuses difficultés qui sont essentiellement liées à la nature de fonctions réactives d'un sucre (hydroxyles). Un choix rigoureux de groupements protecteurs doit permettre de libérer spécifiquement au cours de la synthèse une position choisie. Comme on peut le voir sur la figure 58 les groupes protecteurs peuvent être de nature différentes : les éthers qui demanderont des conditions de déprotections assez fortes (TFA, Pd/C, NaOMe), les esters, ou les acétals qui se déprotègeront dans des conditions plus douces.

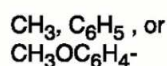
<sup>106</sup> S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau. « Glycals in Organic Synthesis : the Evolution of Comprehensive Strategies for the Assembly of Oligosaccharides and Glycoconjugates of Biological Consequence. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1380-1419.

**Hydroxy protection**
**Ether**

**Acetal**


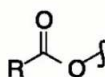
or



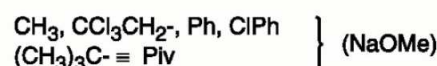
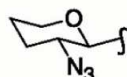
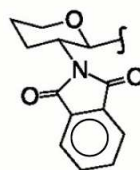
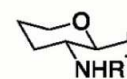
R =



} (TFA or AcOH)

**Ester**


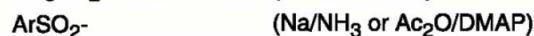
R =


**Amine Protection**

 (H<sub>2</sub>/Pd)

 $\equiv$  Phth (NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)


R =



(MsOH, MeOH)



**Figure 58** : Groupes protecteurs classiques utilisés en chimie des sucres (conditions de déprotections entre parenthèse)<sup>107</sup>.

De plus, la nature du groupement protecteur du carbone en C-2 influence fortement l'orientation de la réaction lors d'une étape de couplage glycosidique. La présence d'un groupe acylé participant en position 2-équatoriale oriente l'attaque du nucléophile du côté le moins encombré, via un intermédiaire dioxocarbénium (assistance anchimérique) (Fig. 59, bas). Dans ce cas, une liaison de type  $\beta$  (1,2 trans) est formée stéréoselectivement. En revanche, lorsque le groupe en C-2 est non participant (N<sub>3</sub>-, BnO-,...) l'effet anomère<sup>108</sup> induit la formation préférentielle de l'isomère  $\alpha$ , mais peut fournir également une quantité non négligeable de l'isomère  $\beta$  (Fig. 59, haut). Il en résulte un mélange de deux diastéréoisomères souvent difficiles à séparer. Toutefois, la nature du solvant peut dans ce cas favoriser une configuration plutôt qu'une autre.

<sup>107</sup> P. Sears, C. H. Wong. « Toward Automated Synthesis of Oligosaccharides and Glycoproteins. » *Science* **2001**, 291, 2344-2350.

<sup>108</sup> E. Juaristi, G. Cuevas. « The Anomeric Effect. » CRC Press, Inc., **1995**.

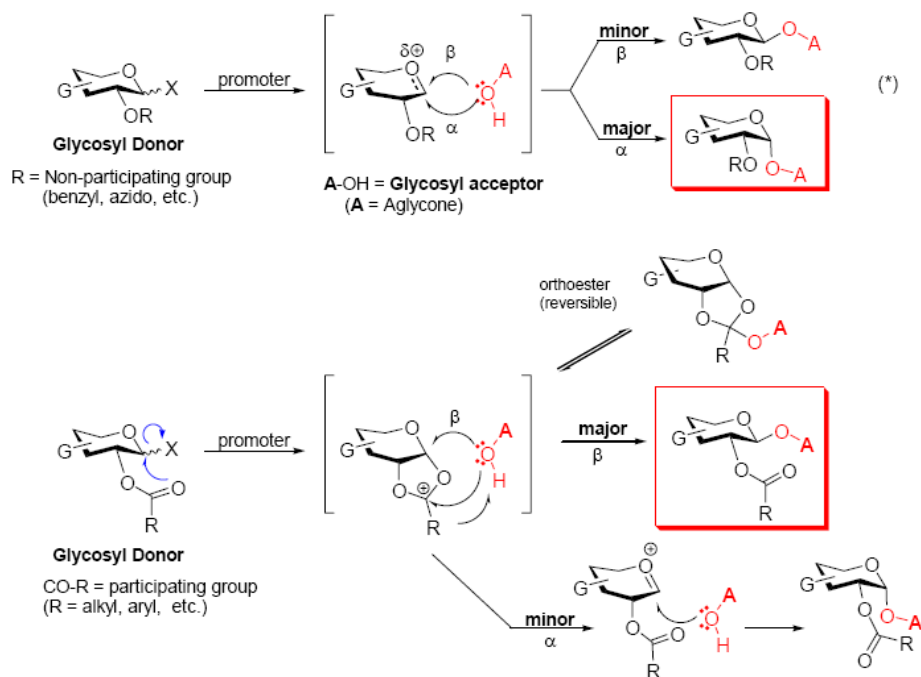


Figure 59 : Mécanisme de glycosylation avec ou sans assistance anchimérique.

### 5.2.2 La nature du solvant :

Le solvant influence d'une manière non négligeable la globalité de la réaction et la stéréochimie, spécialement dans le cas où il n'y a pas de groupe participant en C-2. Tout d'abord, des solvants anhydres sont requis pour éviter la compétition avec l'eau qui conduirait à l'hydrolyse du sucre donneur. De plus, quelques solvants sont capables de former des complexes avec l'intermédiaire oxonium, ce qui va affecter l'orientation du nucléophile. Ceci est expliqué par la formation d'un complexe exo-cyclique avec les solvants qui cachent respectivement la face  $\beta$  et  $\alpha$ . Cet effet sera commenté plus en détail dans une autre partie sur un cas particulier que nous avons rencontré.

En général si un groupe participant est présent en position 2 la réaction suit un mécanisme de type  $SN_2$  dans les solvants non polaires. En revanche, en présence d'un groupe non participant, la nature du solvant permet de favoriser la formation d'un stéréoisomère par rapport à l'autre. L'influence du solvant sur des réactions de types  $SN_1$  a été largement étudiée dans le cas des éthers et des nitriles. Par exemple il a été montré que lorsqu'on réalise la réaction dans le diéthyl éther, les réactions de types  $SN_1$  sont favorisées. En effet l'éther participe en formant un cation oxonium en position équatoriale qui favorise thermodynamiquement la formation des  $\alpha$ -glycosides (Fig. 60).

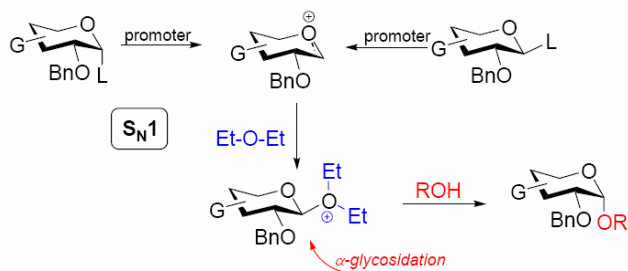


Figure 60 : Influence de l'éther.

L'influence des nitriles (l'effet nitrile) est plus complexe<sup>109</sup>. L'acétonitrile qui est un solvant polaire favorise les réactions de types  $S_N1$ , ce qui implique la formation d'un intermédiaire cation oxonium. Celui-ci sera solvatoché par la face  $\alpha$  formant le complexe ( $\alpha$ -nitrilium-nitrile) cinétiquement contrôlé. Ce complexe donnera finalement l'anomère  $\beta$  après substitution par un alcool. D'un autre côté le complexe ( $\beta$ -nitrilium-nitrile) se formant sur la face  $\beta$  et thermodynamiquement plus stable favorise la formation de l'anomère  $\alpha$ . Dans les deux cas la complexation du nitrile augmente la réactivité du sucre donneur (Fig. 61).

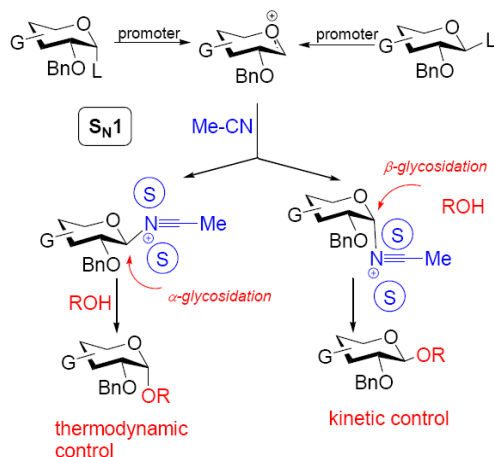


Schéma 61 : Influence de l'acétonitrile.

### 5.3 Synthèse des sucres oxyamines :

Notre méthode d'assemblage par lien oxime nécessite l'incorporation d'une oxyamine sur les sucres en position anomère. L'approche générale permettant d'obtenir ces fonctions est l'introduction en position anomère d'un groupement succinimide ou phthalimide. Quelques méthodes utilisant le N-hydroxysuccinimide (HOSuc) ou le N-hydroxy-phthalimide (HOPht)

<sup>109</sup> D. Vankar, P. S. Vankar, M. Behrendt, R. R. Schmidt. « Synthesis of  $\beta$ -O-glycosides Using Enol Ether and Imidate Derived Leaving Groups. Emphasis on the Use of Nitriles as a Solvent. » *Tetrahedron* **1991**, 47, 9985-9992.

comme agent nucléophile lors de glycosylation ont été décrit dans la littérature<sup>110</sup>. Jurczak et coll. ont réalisés des réaction de Mitsunobu sur la fonction hydroxyle anomérique en présence de HOSuc et HOPht. Malheureusement ce type de réaction ne permet pas de contrôler la stéréochimie car elle agit selon un mécanisme de type SN<sub>2</sub> (inversion de configuration) et ne conduit pas aux produits oxyamines avec de bons rendements. D'autre part, une autre méthode pour incorporer une fonction oxyamine en position anomère est rapportée par R. Roy en 1995<sup>111</sup>. Il décrit une méthode de glycosylation stéréosélective par une réaction de transfert de phase entre un bromure de glycosyle et du N-hydroxysuccinimide (NHS), dont la faible acidité de l'hydrogène (pKa ≈ 6) est compatible avec ces conditions opératoires. La coupure du NHS par hydrazinolyse conduit finalement au dérivé beta-oxyamine stéréosélectivement. Plus récemment, C. R. Bertozzi<sup>112</sup> a montré que les sucres qui possède la fonction nucléophile (oxyamine) peuvent être couplés chimiosélectivement sur un peptide portant une fonction aldéhyde ou cétone. Le glycopeptide obtenu possède alors une configuration identique à celle du sucre de départ. Nous avons également montré l'efficacité de cette méthode au laboratoire.<sup>113</sup>

Une méthode de synthèse plus générale a été développée au laboratoire ces dernières années. Elle permet d'accéder avec de bons rendements aux dérivés α et β oxyamine. La stratégie est représentée sur la figure suivante :

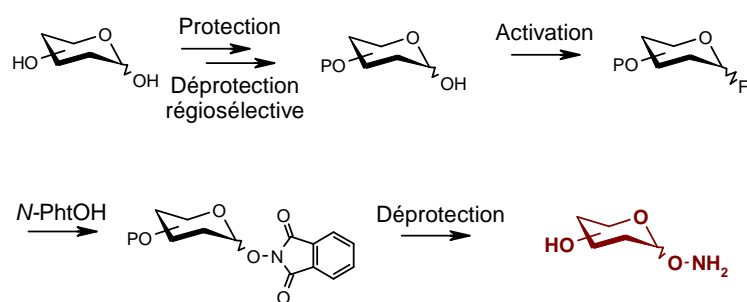


Figure 62 : Stratégie générale pour la synthèse des sucres oxyamines.

<sup>110</sup> E. Grochowski, J. Jurczak. « A New Class of Monosaccharide Derivatives: O-phthalimidohexoses. » *Carbohydrate Res.* **1976**, *50*, C15-C16.

<sup>111</sup> S. Cao, F. D. Tropper, R. Roy. « Stereoselective Phase Transfer Catalysed Syntheses of Glycosyloxysuccinimides and their Transformations into Glycoprobes. » *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6679-6686.

<sup>112</sup> a) E. C. Rodriguez, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi. « Aminooxy-, hydrazide- and thiosemicarbazide- functionalized Saccharides : Versatile Reagents for Glycoconjugate Synthesis. » *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7134-7135 ; b) E. C. Rodriguez, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi. « A Strategy for Chemoselective Synthesis of O-linked Glycopeptides with Native Sugar-peptide Linkages. » *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905-9906.

<sup>113</sup> a) O. Renaudet. « Développement de méthodes chimiosélectives pour la conjugaison de peptides. » *Thèse de doctorat*, **2002**, Université Joseph Fourier de Grenoble.

La stratégie s'articule autour de quatre étapes : (i) protection des fonctions hydroxyles puis déprotections sélectives de la position anomère ; (ii) activation de la position anomère par un fluorure (stable) ; (iii) glycosylation du sucre donneur par le *N*-hydroxy-phthalimide (précurseur de la fonction oxyamine) ; (iv) déprotection de toutes les positions pour obtenir le sucre libre et fonctionnalisé par une oxyamine en position anomère. Cette stratégie varie légèrement d'une synthèse à l'autre en fonction du stéréoisomère souhaité.

Nous avons choisis d'utiliser 4 sucres différents pour le projet qui nous intéresse : le lactose, le fucose, le mannose et le GalNAc (Fig. 63). Ceci permettra d'avoir un choix plus étendu sur les cibles et notamment les lectines qui sont extrêmement spécifiques envers leur ligand.

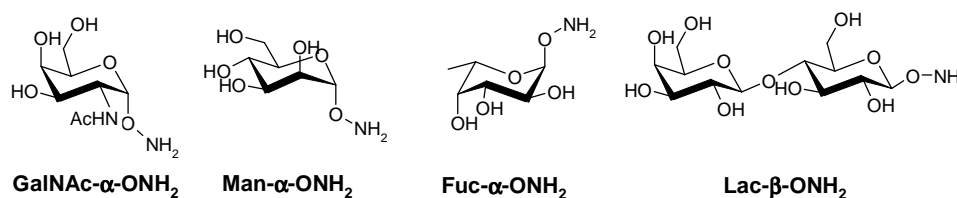


Figure 63 : Différents motifs oligosaccharides synthétisés.

### 5.3.1 Synthèse du dérivé $\alpha$ -mannose oxyamine<sup>83,114</sup> :

Les premiers essais nous ont naturellement conduit vers l'utilisation d'acétate comme groupe protecteur, mais il a été observé au laboratoire que le rendement de couplage et la déprotection finale génèrent un produit secondaire. Nous nous sommes alors tournés vers sur l'utilisation de groupes protecteurs benzyles et sur l'activation de la position anomère par un atome de fluor plus stable que les autres dérivés halogénés (Schéma 9). L' $\alpha$ -D-mannopyranoside de méthyle commercial **23** est préalablement protégé par des groupements benzyles<sup>115</sup>. Cette réaction est effectuée classiquement dans du DMF après déprotonation des fonctions hydroxyles par du NaH et action du bromure de benzyle pour donner le produit **24**. Le produit fluoré est formé à partir du sucre dont la position anomère est libre et de DAST (trifluorure de diéthylaminosulfure) comme donneur de fluorure<sup>116</sup>. Pour cela, le dérivé **25** est obtenu par hydrolyse acide du groupement methoxy anomère, dans un mélange acide acétique / acide sulfurique 1M (4/1) à reflux. L'introduction de l'atome de fluor est réalisée dans le THF en présence de DAST à température ambiante. Le composé **26** est obtenu après 15 à 30

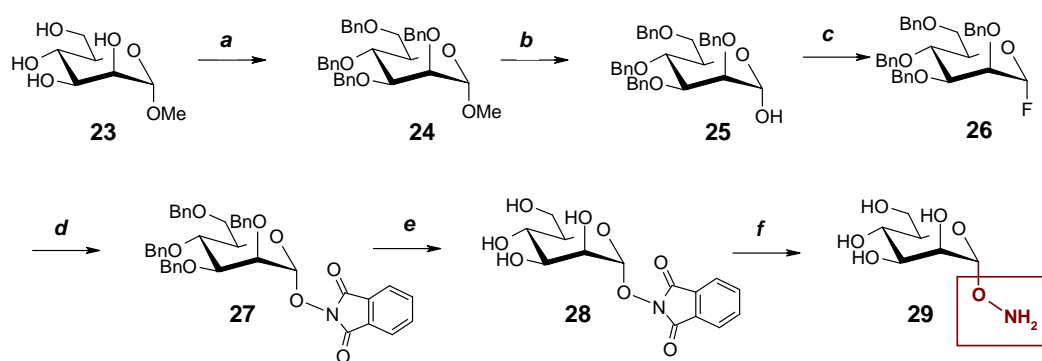
<sup>114</sup> O. Renaudet, P. Dumy. « Expedient Synthesis of Aminoxyated-carbohydrates for Chemoselective Access of Glycoconjugates. » *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7575-7578.

<sup>115</sup> J. S. Brimacombe. « Alkylation of Monosaccharides Using Sodium Hydride. » *Methods in Carbohydr. Chem.* **1972**, 6, 376-378.

<sup>116</sup> G. J. Posner, S. R. Haines. « A Convenient One-step, High-yield Replacement of an Anomeric Hydroxyl Group by a Fluorine Atom using DAST. Preparation of Glycosyl Fluorides. » *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5-8.



min de réaction avec un rendement quantitatif. La glycosylation du composé fluoré **26** est réalisée en présence d'étherate de trifluorure de bore<sup>117</sup> ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) qui est le promoteur le plus employé avec les fluorures de glycosyles donneurs. Cette étape est réalisée dans le dichlorométhane en présence d'une base (triéthylamine), du donneur fluoré et de PhtOH en quantité stoechiométrique. Le  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  en excès (2-4 équivalents) est ajouté en dernier.

**Réactifs :**

(a) NaH, BnBr, DMF, 92% ; (b) AcOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M, reflux, 42% ; (c) DAST, THF, 98% ;  
 (d) PhtOH,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 75% ; (e)  $\text{H}_2$ , Pd/C 10%, MeOH ; (f) MeHNNH<sub>2</sub>, EtOH, 44% après e et f.

**Schéma 9 :** Synthèse du dérivé mannose oxyamine **29**.

La déprotection finale se déroule en deux temps. Les groupements benzyles sont tout d'abord éliminés à la suite d'une hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon dans du méthanol<sup>118</sup>. Ici la réaction doit être rigoureusement contrôlée pour éviter les risques de coupure de la liaison N-O. Le produit **28** obtenu étant soluble dans l'eau, les produits partiellement déprotégés ainsi que les sous-produits formés au cours de cette étape sont extraits à l'aide d'un solvant organique et le produit **28** est purifié par chromatographie sur gel de silice. Enfin une fois la phase aqueuse lyophilisée, la fonction oxyamine est libérée par coupure du phthalimide par la méthylhydrazine. Le produit **29** est finalement isolé par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 50% après ces deux étapes.

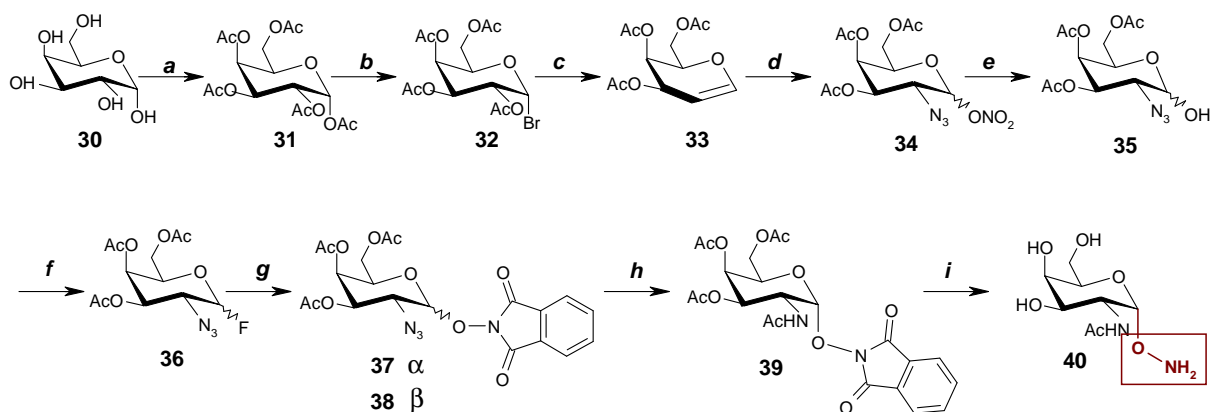
<sup>117</sup> H. Kunz, W. Sager. « Stereoselective Glycosylation of Alcohols and Silyl Ethers Using Glycosyl Fluorides and Boron Trifluoride Etherates. » *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 283-287.

<sup>118</sup> P. Kovac, C. P. J. Glaudemans. « Synthesis of Specially Fluorinated Methyl  $\beta$ -glycosides of (1 $\rightarrow$ 6)-b-D-galactooligosaccharides II. Methyl 4-deoxy-4-fluoro 6-O-(b-D-galactopyranosyl)-b-D-galactopyranoside. » *J. Carbohydr. Chem.* **1984**, 3, 349-358.

### 5.3.2 Synthèse de l'épitope Tn oxyanmine (GalNAc- $\alpha$ -ONH<sub>2</sub>)<sup>83,114</sup> :

Nous nous sommes ensuite intéressés au résidu  $\alpha$ -GalNAc (ou epitope Tn). Du fait de la simplicité de sa structure, ce motif est probablement l'antigène tumoral le plus étudié<sup>119</sup>. Il peut être utilisé comme épitope B-dépendant pour la mise au point de vaccins chimiques anticancéreux<sup>88</sup>. La synthèse de ce motif a notamment été rapporté par Bertozzi en utilisant la méthode de catalyse par transfert de phase<sup>120</sup> (PTC). Nous avons appliqué la stratégie développée au laboratoire pour accéder à ce composé avec de bons rendements (Schéma 10).

Le galactose libre **30** est d'abord protégé en utilisant un mélange anhydride acétique / pyridine<sup>121</sup> pour donner le dérivé peracétylé **31** (Schéma 9). Le dérivé bromé activé **32** est ensuite formé à 0°C grâce à l'action d'une solution d'acide acétique contenant du HBr à 30%<sup>122</sup>. L'étape suivante consiste à préparer le dérivé galactal **33** à partir du composé bromé. Il est obtenu avec un rendement de 75% par une réaction d'élimination réductrice en présence de Zinc dans un mélange eau / acide acétique à 0°C.



**Réactifs :** (a) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, 95%; (b) HBr 30% / AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 98% (c) Zn, AcOH/H<sub>2</sub>O, -15°C à 0°C, 75% ; (d) NaN<sub>3</sub>, CAN, CH<sub>3</sub>CN, -15°C, 77% ; (e) NaNO<sub>2</sub>, dioxane/H<sub>2</sub>O, 80°C, 73% (f) DAST, THF, rendement quantitatif (g) PhtOH, BF<sub>3</sub>:Et<sub>2</sub>O, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 38% pour  $\alpha$ , 50% pour  $\beta$ ; (h) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH/Ac<sub>2</sub>O, 76% ; (i) MeNHNH<sub>2</sub>, EtOH, 90%.

**Schéma 10** : Synthèse du dérivé GalNAc oxyanmine **40**.

<sup>119</sup> a) H. Kunz, S. Birnbach. « Synthesis of O-glycopeptides of the tumor associated Tn- and T-Antigen type and their binding to Bovine Serum Albumin. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360-362; b) J. M. Kim, R. Roy. « Oligomeric glycopeptidomimetics bearing the cancer related Tn-Antigen. » *Tetrahedron* **1997**, 38, 3487-3490.

<sup>120</sup> a) L. A. Marcaurelle, E. C. Rodriguez, C. R. Bertozzi. « Synthesis of an Oxime-Linked Neoglycopeptide with Glycosylation-Dependent Activity Similar to Its Native Counterpart. » *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8417-8420 ; b) L. A. Marcaurelle, Y. Shin, S. Goon, C. R. Bertozzi. « Synthesis of Oxime-Linked Mucin Mimics Containing Tumor-Related Tn and Sialyl Tn Antigens. » *Org. Lett.* **2001**, 23, 3691-3694.

<sup>121</sup> M. L. Wolffrom, A. Thompson. « Acetylation. » *Methods in Carbohydr. Chem.* **1963**, 2, 211-215.

<sup>122</sup> R. U. Lemieux. « Acylglycosyl halides. » *Methods in Carbohydr. Chem.* **1963**, 2, 221-225.

Afin d'incorporer une fonction azoture en position 2 nous réalisons une réaction d'azidonitration<sup>123</sup>. L'utilisation du D-galactal comme précurseur de dérivés N-acétyle galactosyles est largement employée depuis plusieurs années. Cette étape repose sur la transformation du sucre **33** en dérivé galactosyle portant un azoture en position 2-équatoriale et un groupement nitrate en position anomère. Cette réaction se déroule en présence d'un excès de nitrate d'ammonium cérique (CAN) et d'azoture de sodium dans l'acétonitrile à -15°C. On obtient le produit **34** avec un rendement de 77%. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'activation du sucre par un fluorure nécessite la libération d'une fonction hydroxyle en position anomère. Pour cela nous avons choisi d'hydrolyser le dérivé nitrate dans un mélange eau / dioxane à 80°C en présence de nitrate de sodium<sup>124</sup>. Cette réaction de dénitruration permet d'obtenir le produit **35** avec un rendement de 73%. Ensuite le dérivé **36** est préparé en utilisant le DAST puis le motif phthalimide est introduit en position anomère en présence de BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O selon les procédures décrites précédemment pour obtenir deux anomères **37** (α) et **38** (β). A ce stade nous effectuons une purification par chromatographie sur gel de silice afin de séparer les deux anomères α et β avec un rendement respectif de 38% et 50%. Par la suite le composé **39** est obtenu par réduction et acétylation simultanée de la fonction azoture du dérivé **38**. La réaction se déroule dans un mélange méthanol/anhydride acétique (9/1) en présence de Pd/C sous atmosphère d'hydrogène. La déprotection finale se déroule en présence de methylhydrazine qui permet de libérer les fonctions hydroxyles des acétates et d'obtenir la fonction oxyamine en position anomère. Le composé **40** est finalement obtenu après précipitation dans un mélange MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec un rendement de 90%.

### 5.3.3 Synthèse du dérivé β-lactose oxyamine<sup>83,114</sup> :

Bien que la stratégie générale reste la même, nous avons procédé d'une manière légèrement différente (Schéma 11). Nous avons en effet choisi de protéger les fonctions hydroxyles par des groupements acétates plus faciles à éliminer que les groupements benzyles. Ces derniers sont d'ailleurs rarement utilisés pour la protection d'oligosaccharides de grande taille. Dans un premier temps le lactose commercial **41** est péracétylé afin d'obtenir le produit **42**, puis la fonction acétate en position anomère est désacétylée régioselectivement<sup>125</sup>. Cette réaction se déroule en présence d'un mélange composé d'éthylènediamine et d'acide acétique en quantité

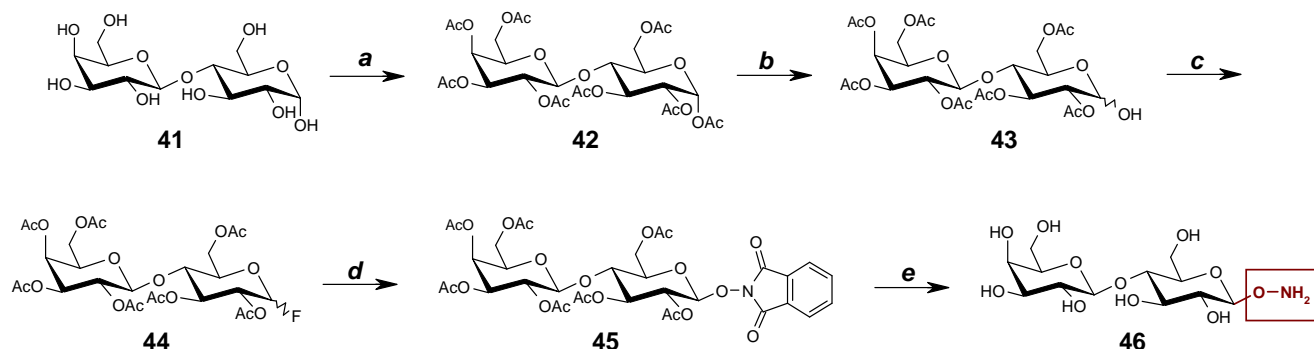
---

<sup>123</sup> R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe. « The Azidonitration of tri-*O*-acetyl-D-galactal. » *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1251.

<sup>124</sup> G. R. Grundler, R. R. Schmidt. « Anwendung des Trichloroacetimidatverfahrens auf 2-azidoglucose- und 2-azidogalactose-derivate. » *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826-1847.

<sup>125</sup> J. Zhang, P. Kovacs. « An Alternative Method for Regioselective, Anomeric Deacetylation of Fully Acylated Carbohydrates. » *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, 18, 461-469.

stoechiométrique dans du THF à température ambiante. Cette méthode s'est avérée efficace et sélective puisque le composé **43** est obtenu avec un rendement de 93%.



**Réactifs :** (a) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, 95% ; (b) éthylènediamine, AcOH, THF, 93% ; (c) DAST, THF, rendement quantitatif ; (d) PhIOH, BF<sub>3</sub>:Et<sub>2</sub>O, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% ; (e) MeNHNH<sub>2</sub>, 60%.

**Schéma 11 :** Synthèse du dérivé lactose oxyamine **46**.

La formation successive des dérivés fluorés et β-phthalimido **44** et **45** puis la déprotection finale est réalisée selon la procédure décrite précédemment. La principale difficulté rencontrée est une nouvelle fois la purification du produit final **46** dont la polarité (plus prononcée que les monosaccharides) a été la principale raison. Même si la réaction de déprotection est quantitative, le dérivé **46** est obtenu avec un rendement de 60% après purification par précipitation dans un mélange méthanol/dichlorométhane.

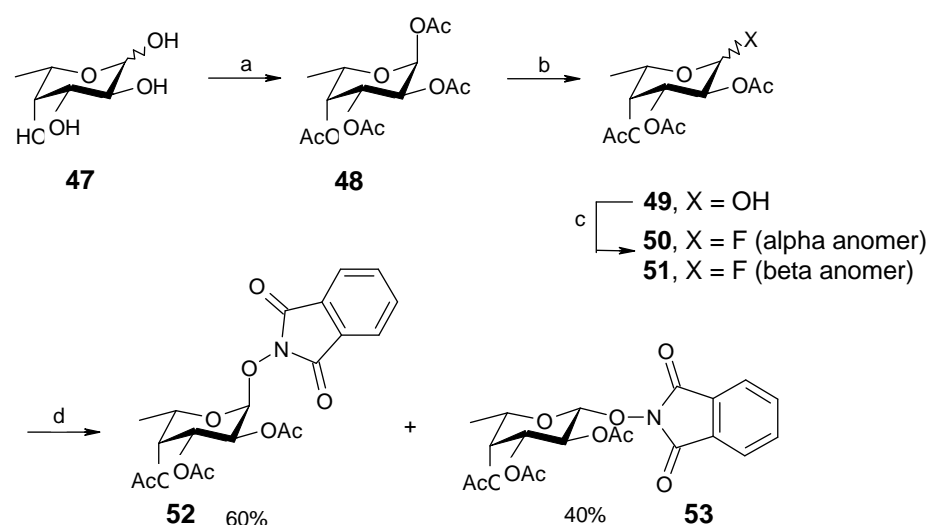
### 5.3.4 Synthèse du dérivé α-fucose oxyamine :

Nous nous sommes intéressés très récemment au L-fucose dans le cadre d'un projet européen COST (Action D-34). En effet, ce ligand est impliqué dans de nombreux processus biologiques<sup>126</sup>. Par exemple, il a été montré récemment que la colonisation du poumon par *Pseudomonas aeruginosa* qui est responsable d'infections chez les malades affectés par la mucoviscidose débute avec l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'hôte via la lectine PAIIL présente à sa surface<sup>127</sup>. Il constitue donc une cible de choix pour le développement d'agents anti-bactériens.

<sup>126</sup> E. D. J. Becker, J. B. Lowe. « Fucose: Biosynthesis and Biological Function in Mammals. » *Glycobiology* **2003**, *13*, 41R–53R.

<sup>127</sup> E. Mitchell, C. Houles, D. Sudakevitz, M. Wimmerova, C. Gautier, S. Pérez, A. M. Wu, N. Gilboa-Garber, A. Imberly. « Structural Basis for Oligosaccharide-mediated Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. » *Nature Struct. Biol.* **2002**, *9*, 918–921.

Les étapes de synthèses pour accéder au fucose modifié par une oxyamine sont les mêmes que pour le lactose oxyamine. Le L-fucopyranose commercial **47** est d'abord acétylé en présence de pyridine et d'anhydride acétique pour donner le produit **48**. La position anomère du dérivé **48** est ensuite déprotégée régiosélectivement par action d'un mélange d'éthylènediamine et d'acide acétique (1/1) dans le THF afin d'obtenir le composé **49** avec 86% de rendement. Le fluor est introduit en position anomère comme groupe activant en utilisant le DAST dans le THF. Le composé fluoré a été obtenu sous forme de mélange  $\alpha$  et  $\beta$  (1,2/1) avec 72% de rendement (Schéma 12).



**Réactifs:** (a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine, 6 h, 97%; (b) éthylènediamine,  $\text{AcOH}$ , THF, 12 h, 86%;  
(c) Diéthylaminosulfur trifluorure, THF, 1 h, 72% ( $\alpha/\beta$  anome, 1.2/1);  
(d) N-hydroxyphthalimide,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1 h, 77%.

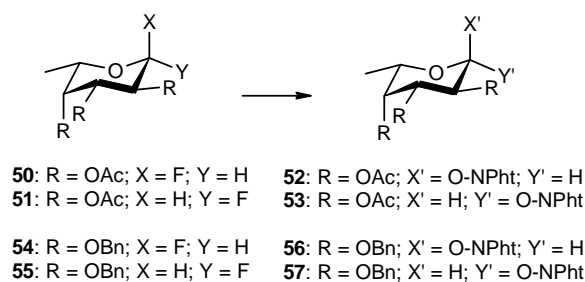
**Schéma 12** : Synthèse du dérivé fucose-phthalimide.

Nous avons tout d'abord effectué la glycosylation sur le mélange **50**, **51** en présence de N-hydroxyphthalimide, de triéthylamine et de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  comme promoteur dans le dichlorométhane. Les anomères  $\alpha$ - et  $\beta$ -fucopyranosyl N-oxyphthalimide obtenus sont séparés par chromatographie sur gel de silice puis recristallisés. De façon étonnante le rapport anomérique  $\alpha/\beta$  balance faiblement en faveur de l'anomère  $\alpha$  (1,5/1). En effet la présence de groupe acétate en position 2 devrait favoriser le formation de lien 1,2 *trans*-glycosydique du a l'assistance de ce même groupe acétate<sup>128</sup>. Ces résultats indiquent une influence mineure du groupe acétate en position 2 dans la stéréochimie de la réaction. Nous nous sommes donc

<sup>128</sup> a) G. Wulf, G. Rohle. « Results and Problems of O-Glycoside Synthesis. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, 13, 157-170; b) K. Toshima, K. Tatsuta. « Recent progress in O-glycosylation Methods and its Application to Natural Products Synthesis. » *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1503-1531; c) G. J. Boons. « Synthetic Oligosaccharides: Recent Advances. » *Drug Discov. Today* **1996**, 1, 331-342.

intéressés à la stéréochimie de cette réaction de glycosylation en faisant varier le solvant, le groupe protecteur en position 2 et la stéréochimie du sucre donneur fluoré<sup>129</sup>.

Pour commencer nous avons donc préparés les dérivés fluorés  $\alpha$  et  $\beta$  en les purifiant par chromatographie sur gel de silice pour obtenir respectivement 39% et 33% d'anomère pur. Afin d'évaluer le rôle du groupe acétate en position 2 nous avons préparés également les dérivés fluorés comportant des groupes benzyles comme protections des fonctions hydroxyles selon la même procédure que pour le mannose. Les glycosylations sont toutes effectuées dans les mêmes conditions opératoires mis à part le solvant (Tableau 6). Toutes les réactions ont été réalisées à température ambiante dans des solvants anhydre en présence de N-hydroxyphthalimide (1 équivalent),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (4 équivalents) et de triéthylamine (1 équivalent) pendant 1 heure. Les rendements non optimisés et la stéréochimie ont été déterminés par intégration des pics du profil CLHP du brut réactionnel à 214 nm (figure 63).



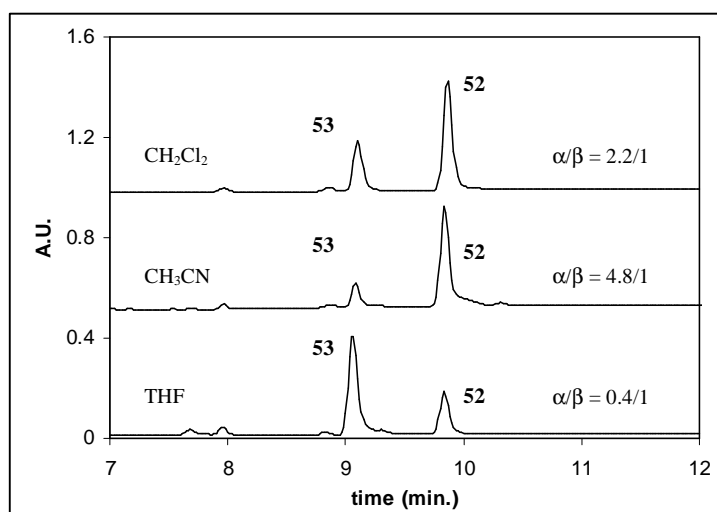
Solvent	Fluoride donor			Glycosylation Product (yield)
	Compound	Anomer	Protection at C-2	
Acetonitrile	<b>50</b>	Alpha	Acetate	$\alpha/\beta$ anomers <b>52/53</b> = 4.8/1 (81 %)
	<b>51</b>	Beta	Acetate	$\alpha/\beta$ anomers <b>52/53</b> = 3.7/1 (86 %)
	<b>54</b>	Alpha	Benzyl	$\alpha$ anomer <b>56</b> only (68 %)
	<b>55</b>	Beta	Benzyl	$\alpha$ anomer <b>56</b> only (73 %)
Dichloromethane	<b>50</b>	Alpha	Acetate	$\alpha/\beta$ anomers <b>52/53</b> = 2.2/1 (88 %)
	<b>51</b>	Beta	Acetate	$\alpha/\beta$ anomers <b>52/53</b> = 0.7/1 (81 %)
	<b>54</b>	Alpha	Benzyl	$\alpha$ anomer <b>56</b> only (60 %)
	<b>55</b>	Beta	Benzyl	$\alpha$ anomer <b>56</b> only (66 %)
Tetrahydrofuran	<b>50</b>	Alpha	Acetate	$\alpha/\beta$ anomers <b>52/53</b> = 0.4/1 (80 %)
	<b>51</b>	Beta	Acetate	$\alpha/\beta$ anomers <b>52/53</b> = 0.4/1 (75 %)
	<b>54</b>	Alpha	Benzyl	$\alpha/\beta$ anomers <b>56/57</b> = 19/1 (50 %)
	<b>55</b>	Beta	Benzyl	$\alpha/\beta$ anomers <b>56/57</b> = 16/1 (63 %)

**Tableau 6 :** Rapport anomérique obtenu dans les conditions testées.

Dans les solvants polaires aprotiques tels que l'acétonitrile, les glycosylations effectuées sur les dérivés fluorés  $\alpha$  et  $\beta$  donnent un large excès de produit glycosylé  $\alpha$  (4,8/1 et 3,7/1). Cette

<sup>129</sup> V. Duléry, O. Renaudet, C. Philouze, P. Dumy. « Aminoxyated Alpha or Beta L-fucopyranosyl: a Key Intermediate for Chemoselective Access of Fucose-containing Glycoconjugates. » *Carbohydrate Res.* **2007**, *342*, 894-900.

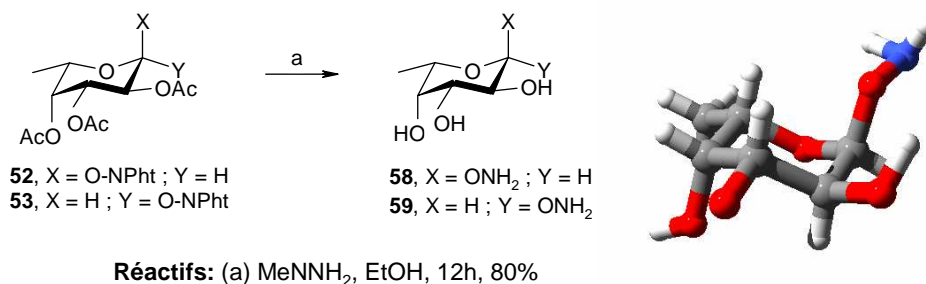
stéréosélectivité peut être expliqué par un mécanisme de type  $SN_1$  où l'ion oxonium formé est stabilisé par l'acétonitrile. Cela favorise la formation du dérivé  $\alpha$  glycosylé grâce à l'effet anomère et diminue l'influence de l'assistance anchimérique qui devrait assurer préférentiellement la formation du lien beta 1,2-*trans* par l'attaque du nucléophile ( $PhtO^-$ ) sur la face  $\alpha$ . D'autre part, aucune trace de beta glycosylation a été observée lorsque la position 2 est protégée par des groupements benzyles, ce qui signifie que le composé le plus stable thermodynamiquement a été formé.



**Figure 63:** Exemple de profil CLHP de glycosylation entre  $\alpha$ -fluoré **50** et N-hydroxyphthalimide (Gradient de 5 à 100% de B en 15 minutes).

Les résultats obtenus dans le dichlorométhane à partir des composés fluorés et protégés par des benzyles sont les mêmes que ceux cités précédemment (pour les mêmes raisons). Cependant lorsque nous réalisons la glycosylation à partir du composé alpha-fluoré et protégé par des acétates, nous obtenons de façon majoritaire le produit alpha-glycosylé (2,2/1) alors qu'une faible sélectivité est observée pour la glycosylation se faisant à partir du composé beta-fluoré (0,7/1). En effet, on peut supposer que dans les solvants apolaires la stabilisation du cation oxonium est plus faible que dans les solvants polaires. La formation du composé beta-glycosylé induite par la participation du groupe en position 2 est plus importante que dans l'acétonitrile. Cette réactivité donne une légère préférence au composé beta-glycosylé surtout que le donneur fluoré comporte un lien 1,2-*trans* (0,7/1). Par contre, des différences de sélectivité ont été remarquées lors des glycosylations faites dans le tétrahydrofurane. Tout d'abord, nous avons observé la formation majoritaire attendue du composé beta-glycosylé, que ce soit à partir du composé alpha- ou bêta-fluoré (0,4/1). Par contre lorsque la formation du lien 1,2-*cis* est normalement favorisée par l'effet anomère, nous observons des traces de

composé beta-glycosylé (19/1 et 16/1) en partant des composés fluorés protégées par des benzyles.



**Schéma 13** : Déprotection finale pour obtenir le fucose oxyamine **58** - Structure RX du composé **58**.

La déprotection finale est effectuée par traitement des composés **52** et **53** avec de la méthylhydrazine dans l'éthanol pendant une nuit (Fig. 13, gauche). L' $\alpha$ -fucose oxyamine **58** est obtenu sous forme de cristaux après évaporation et cristallisation dans l'éthanol alors que le  $\beta$ -fucose oxyamine **59** est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice. En mesurant la constante de couplage entre H-1 et H-2 des composés **58** et **59** ( $J_{1,2} = 3.4$  Hz,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz respectivement) nous sommes en mesure de déterminer la configuration des centres anomériques, ce qui a été confirmé par l'analyse par diffraction aux rayons X (Fig. 13, droite).





---

*Chapitre 2 :*  
*Synthèse combinatoire*  
*d'hétéroglycoclusters*

---



## Chapitre 2 : Synthèse combinatoire d'hétéroglycoclusters

---

Les interactions multivalentes sucre/protéine jouent un rôle fondamental dans la plupart des phénomènes de reconnaissance en biologie. En particulier, les processus de régulation ou de prolifération cellulaire, les mécanismes d'infection par des agents pathogènes ou de défenses immunitaires impliquent des glycoconjugués exprimés à la surface des cellules. La conception de molécules capables de mimer efficacement la polyvalence des ligands osidiques présente donc des intérêts considérables et est l'objet de nombreuses études ces dernières années.

### 1. Les interactions sucres-protéine :

#### 1.1 Les Glyconconjugués :

Les glycoconjugués sont des molécules constitués d'une partie glucidique (mono- ou oligosaccharide) liée de manière covalente à une partie non glucidique (aglycone). Ce sont des composants essentiels des membranes cellulaires, de la matrice extracellulaire et des liquides biologiques. Les fonctions biologiques associées à la partie glucidique des glycoconjugués sont aussi nombreuses que leur diversité structurale. Cependant deux grandes familles de fonctions peuvent être mis en évidence : la fonction structurale et celle de reconnaissance moléculaire. Je me limiterai à cette dernière famille.

Les oligosaccharides participent à de nombreux phénomènes de reconnaissance moléculaire de type récepteur-ligand impliquant des protéines membranaires ou solubles et de nombreuses études confirmant leur rôle dans la vie sociale des cellules<sup>130</sup> (Fig.64). Parmi ces protéines membranaires, les lectines représentent la classe la plus connue. Comme on le verra par la suite, les lectines reconnaissent généralement les monomères terminaux des oligosaccharides. Au niveau des structures périphériques, on trouve souvent des epitopes antigéniques comme les déterminants des groupes sanguins ABO (antigènes A, B, H) et Lewis (Lewis X, et Y) ainsi que leur dérivé sialylés. Par ailleurs, il a été montré que des anomalies de glycosylation accompagnent fréquemment les états physiologiques ou pathologiques anormaux comme le cancer. En conséquence, ce sujet reçoit maintenant une très grande attention et de nombreuses études ont été effectuées.

---

<sup>130</sup> A. Varki. « Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories Are Correct. » *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.

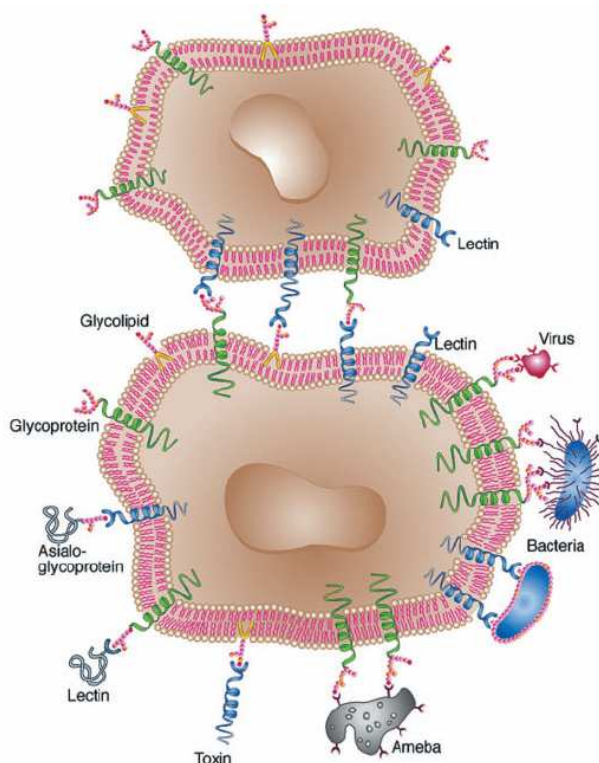


Figure 64 : Exemple de rôles des glycoconjugués situés à la surface cellulaire.

## 1.2 Les lectines :

### 1.2.1 Généralités :

Le mot lectine dérive du verbe latin *legere* qui veut dire « sélectionner » ou « choisir ». Les lectines ont été définies comme des protéines d'origine non-immune qui se lient spécifiquement et de façon réversible aux sucres et ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats<sup>131</sup>. Ce sont des protéines ubiquitaires, car elles se retrouvent dans toutes les classes d'organismes, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. Elles sont aussi appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les érythrocytes) et les glycoconjugués. Ce phénomène est souvent utilisé pour la détection, la purification et la caractérisation des lectines. Cette caractéristique très importante des lectines est due au fait que ces protéines ont des sites d'interactions multiples. Les premières lectines furent identifiées chez les plantes au début du vingtième siècle mais la communauté scientifique ne commença à s'intéresser à cette classe de protéines qu'à partir des années soixante, en concomitance avec la naissance de la glycobiologie.

<sup>131</sup> M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis. « Lectins : Tools for the Molecular Understanding of the Glycocode » *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1593- 1609.

La découverte majeure que certains états physiologiques et pathologiques étaient associés à un changement de l'état de glycosylation des cellules fut possible grâce à l'utilisation des lectines. Le nombre de travaux publiés sur les lectines a vu une grande croissance principalement grâce à leur abondance dans tous les organismes vivants, accompagné d'une certaine facilité de purification. Dans les derniers temps, on s'est de plus en plus intéressé aux rôles biologiques de ces protéines. On s'est aperçu tout de suite de l'extrême variabilité des lectines, d'abord en terme de structure primaire, et à la suite des premières structures résolues par diffraction des rayons X, en terme de structure tridimensionnelle<sup>132</sup>.

L'intérêt majeur qui pousse aujourd'hui la recherche sur les lectines est lié à leur capacité unique de « lire » l'information biologique qui est codifiée dans la structure tridimensionnelle des sucres. Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie aux oligosaccharides terminés par un acide sialique qui sont situés sur la surface des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures. De la même façon, les lectines situées sur la surface des bactéries, des virus ou des parasites intestinaux reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc facilitent les processus de colonisation et d'infection.

Les lectines animales ont également été étudiées en détail en raison de leurs rôles particulièrement importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. Par exemple, il a été montré que l'adhésion des lymphocytes sur la paroi interne des vaisseaux sanguins, processus important des mécanismes d'inflammation, se déroule par l'intermédiaire de lectines particulières situées sur la surface des vaisseaux sanguins appelées sélectines<sup>133</sup>.

### 1.2.2 Spécificités et affinités :

Il est intéressant de noter que la plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles

---

<sup>132</sup> A. Imberty, S. Pérez. « Structure, Conformation and Dynamic of Bioactive Oligosaccharides: Theoretical Approaches and Experimental Validations. » *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4567-4588.

<sup>133</sup> M. Bevilacqua, E. Butcher, Barbara Furie, Bruce Furie, M. Gallatin, M. Gimbrone, J. Harlan, K. Kishimoto, L. Lasky, R. McEver, J. Paulson, S. Rosen, B. Seed, M. Siegelman, T. Springer, L. Stoolman, T. Tedder, A. Varki, D. Wagner, I. Weissman, G. Zimmerman. « Selectins: A family of Adhesion Receptors. » *Cell* **1991**, *67*, 233.

qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides<sup>134</sup>. Parmi les monosaccharides le plus souvent reconnu par les lectines, on retrouve le mannose, le fucose, le galactose/GalNAc et la N-acetylglucosamine. Très peu de lectines reconnaissent l'acide sialique sous la forme de monosaccharide. (Tableau 7)

Lectine	Nom	Organisme	Affinité
<b>Lectines reconnaissant le mannose</b>			
<b>ConA</b>	Concanavalin A	<i>Canavalia ensiformis</i>	Structures $\alpha$ -mannosidiques
<b>LCH</b>	Lentil lectin	<i>Lens culinaris</i>	regions $\alpha$ -mannosylées des structures comprenant des fucoses
<b>GNA</b>	Snowdrop lectin	<i>Galanthus nivalis</i>	Structure riche en mannoses $\alpha$ 1-3 et $\alpha$ 1-6
<b>Lectines reconnaissant le galactose</b>			
<b>ECL</b>	Coral Tree	<i>Erythrina cristagalli</i>	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R
<b>PNA</b>	Peanut Agglutinin	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (Antigen T)
<b>AIL</b>	Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	(Sia)Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (Antigen T)
<b>VVL</b>	Hairy vetch lectin	<i>Vicia villosa</i>	GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr (Antigen Tn)
<b>Lectines reconnaissant l'acide sialique / N-acetylglucosamine</b>			
<b>WGA</b>	Wheat germ agglutinin	<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc, Neu5Ac (acide sialique)
<b>SNA</b>	Elderberry lectin	<i>Sambucus nigra</i>	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal(NAc)-R
<b>MAL</b>	Maackia amurensis lectin	<i>Maackia amurensis</i>	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R
<b>Lectines reconnaissant le fucose</b>			
<b>UEA</b>	Ulex europaeus agglutinin	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc $\alpha$ 1-2Gal-R
<b>PAILL</b>	Pseudomonas aeruginosa lectin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fucose

Tableau 7 : Spécificités des lectines.

<sup>134</sup> N. Sharon. « History of Lectins: from Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. » *Glycobiology* **2004**, 14, 53R-62R.

A part quelques exceptions<sup>135</sup>, ces lectines n'ont pas une très grande affinité pour leurs ligands monosaccharidiques, avec une constante d'affinité  $K_a$  qui est de l'ordre de  $10^3$ - $10^4$   $M^{-1}$ . En général, la spécificité est forte pour un monosaccharide donné et peu de substitutions sont autorisées même si certains monosaccharides montrent des similarités structurales importantes. Dans le GlcNAc et dans l'acide sialique le groupement NHAc et le groupement OH adjacent ont la même orientation spatiale (trans). Cette situation est encore plus évidente dans les cas du mannose et du fucose, qui montrent trois hydroxyles (2,3,4 chez le mannose et 4,3,2 chez le fucose) dans la même configuration spatiale. De nombreuses lectines qui reconnaissent le mannose peuvent ainsi se fixer au fucose (ou vice-versa), bien qu'avec une affinité plus ou moins importante.

La deuxième classe de lectines est formée par celles qui nécessitent un oligosaccharide spécifique, comme par exemple la cyanovirine-N qui reconnaît des glycanes de type oligomannose tels que la glycoprotéine gp120 du virus VIH<sup>136</sup> ou la toxine de choléra qui est spécifique pour le motif ganglioside GM1 présent sur la surface de cellules<sup>137</sup>. L'affinité montrée pour les oligosaccharides est généralement beaucoup plus élevée que pour les monosaccharides. Ces dernières lectines montrent parfois des  $K_a$  tout à fait remarquables qui peuvent atteindre le  $10^7$ - $10^8$   $M^{-1}$ .

### 1.2.3 Types d'interactions dans le site de reconnaissance :

Un grand nombre d'informations sur les modes de reconnaissance ont été établies sur la base de l'analyse cristallographique des complexes lectine-sucre et sont disponibles sur la « PDB » (Protein Data Bank). Dans les lectines spécifiques pour les monosaccharides, les sites de liaison sont généralement des dépressions peu profondes sur la surface de la protéine. Par contre, dans les lectines spécifiques pour les oligosaccharides les sites de liaison sont plus profonds et montrent une excellente complémentarité pour le ligand qui ressemble à l'interaction protéine-substrat chez les enzymes.

---

<sup>135</sup> E. P. Mitchell, C. Sabin, L. Šnajdrová, M. Pokorná, S. Perret, C. Gautier, C. Hofr, N. Gilboa-Garber, J. Koča, M. Wimmerová, A. Imberty. « High affinity fucose binding of *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-IIL: 1.0 Å resolution crystal structure of the complex combined with thermodynamics and computational chemistry approaches. » *Proteins: Struct. Funct. Bioinfo.* **2005**, 58, 735-746.

<sup>136</sup> I. Botos, B. R. O'Keefe, S. R. Shenoy, L. K. Cartner, D. I. M. Ratner, P. H. Seeberger, M. R. Boyd, A. Wlodawer. « Structures of the Complexes of a Potent Anti-HIV Protein Cyanovirin-N and High Mannose Oligosaccharides. » *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 34336-34342.

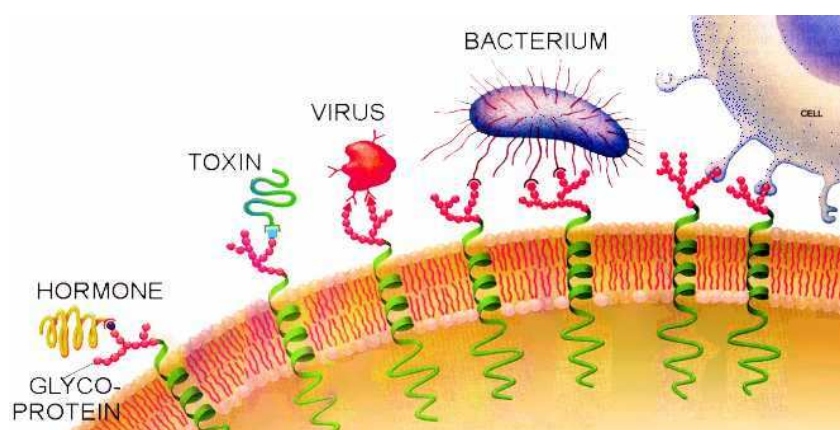
<sup>137</sup> E. A. Merritt, T. K. Sixma, K. H. Kalk, B. A. M. van Zanten, W. G. J. Hol. « Galactose-binding site in *Escherichia Coli* heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). » *Mol. Microbiology*, **1994**, 13, 745-753.



Les liaisons lectine/sucres se produisent grâce à un ou plusieurs types d'interaction. Tout d'abord, les liaisons hydrogène entre la lectine et le ligand sont des interactions fortes et très directionnelles, ce qui permet d'atteindre une bonne affinité et spécificité. Les chaînes latérales des résidus chargés comme l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine et l'arginine sont souvent impliquées dans ces liaisons avec les ligands. Les groupements NH ou CO de la chaîne principale de la protéine peuvent également participer à la reconnaissance. Par ailleurs, une importante contribution à la force de l'interaction vient parfois des interactions hydrophobes. Les sucres sont des molécules très polaires mais la disposition des groupements OH créer des zones hydrophobes qui peuvent donner lieu à des interactions avec les résidus aromatiques, comme la tyrosine ou le tryptophane. Enfin, la présence des cations permet généralement à la lectine d'augmenter son affinité pour le sucre. Par exemple, l'exceptionnelle affinité de la PAIIL pour le fucose (ordre du micromolaire) peut être expliquée par la forte interaction entre le sucre et deux atomes de calcium<sup>135</sup>. De plus, ces cations peuvent favoriser le positionnement d'un acide aminé impliqué dans l'interaction avec le sucre<sup>138</sup> (comme par exemple  $Mn^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  pour ConA).

### 1.3 La multivalence :

Dans le monde vivant, la plupart des processus physiologiques ou pathologiques reposent sur la reconnaissance entre des glycoconjugués et des récepteurs. Comme l'illustre la figure 65, ces interactions concernent l'adhésion d'hormones ou de toxines, les infections virales ou bactériennes ou la communication entre les cellules.



**Figure 65 :** Illustration du rôle des interactions multivalentes dans les processus physiopathologiques.

<sup>138</sup> H. Lis, N. Sharon. « Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. » *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.

Comme nous venons de le voir, les interactions entre les monosaccharides (ou la partie saccharidique des glycoconjugués exprimés à la surface cellulaire) et les lectines spécifiques membranaires ou solubles nous intéressent plus spécialement, car elles jouent un rôle central dans la plupart de ces phénomènes biologiques. Bien que l'affinité pour leur ligand soit généralement faible avec des constantes d'association de l'ordre du millimolaire (en comparaison avec celles rencontrées entre une enzyme et un substrat), ces interactions peuvent présenter une grande spécificité et une avidité jusqu'à 1000 fois plus importante dans le cas de ligands multivalents.

### 1.3.1 Définition :

Les interactions multivalentes représentent un concept fondamental en biologie et présentent des caractéristiques que les interactions monovalentes n'ont pas. Elles requièrent généralement deux partenaires : une molécule multivalente qui possède des motifs de reconnaissance multiples (protéine, oligosaccharide), et un récepteur possédant des sites de reconnaissance adéquats<sup>139</sup>. L'efficacité de la reconnaissance multivalente repose essentiellement sur un effet de synergie entre les interactions simultanées et coopératives de ces deux partenaires. Ces phénomènes coopératifs nécessitent un arrangement spatial précis du récepteur, une présentation des ligands dans la bonne orientation et un espacement adéquat leur permettant d'accéder à plusieurs sites de liaison. L'avantage gagné par la multivalence d'un ligand est généralement plus important que celui gagné par la somme d'interactions individuelles<sup>139</sup>. Cette observation, d'abord décrite par Lee, est connue sous le nom de « glycoside cluster effect »<sup>140</sup>. D'autre part, elles peuvent avoir des effets agonistes/antagonistes différents de ceux observés avec des systèmes monovalents.

### 1.3.2 Les ligands multivalents :

Un grand nombre de molécules multivalentes ont été synthétisées et étudiées comme inhibiteurs ou effecteurs biologiques<sup>141</sup>. Ils se définissent par la présentation de plusieurs motifs identiques sur une structure « porteuse » pour former un homocluster. En particulier,

---

<sup>139</sup> M. Mammem, S. K. Choi, G. M. Whitesides. « Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2754-2794.

<sup>140</sup> Y. C. Lee, R. T. Lee. « Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. » *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; Y. C. Lee, R. T. Lee. « Affinity Enhancement by Multivalent Lectin-carbohydrate Interaction. » *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543-551; J. J. Lundquist, E. J. Toone. « The Cluster Glycoside Effect. » *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.

<sup>141</sup> L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong. « Synthetic Multivalent Ligands in the Exploration of Cell-surface Interactions. » *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703; J. J. Lundquist, S. D. Debenham, E. J. Toone, « Multivalency Effects in Protein-Carbohydrate Interaction: The Binding of the Shiga-like Toxin 1 Binding Subunit to Multivalent C-Linked Glycopeptides. » *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8245-8250.

les dendrimères<sup>142</sup>, des cyclodextrines<sup>143</sup>, des calixarènes<sup>144</sup>, des porphyrines<sup>145</sup>, des polymères<sup>146</sup>, des protéines porteuses<sup>147</sup>, des adamantane<sup>148</sup> ou même des sucres<sup>149</sup> constituent des structures très variées couramment employées pour former des glycocluster de (Fig. 66).

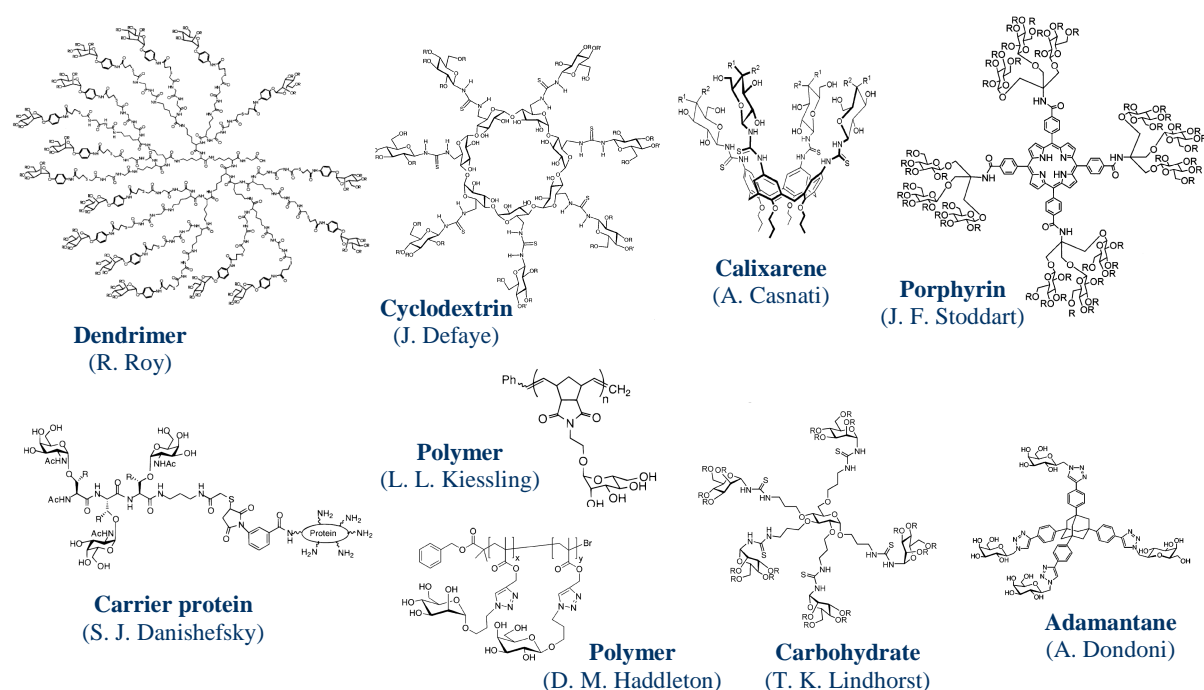


Figure 66 : Structure de différents glycoclusters.

Parmi les nombreuses études décrites dans la littérature, le composé développé par Bundle et coll. représente un exemple particulièrement convaincant de l'utilité des glycoclusters en biologie.

<sup>142</sup> a) M.-G. Baek, R. Roy. « Synthesis and Protein Binding Properties of T-antigen Containing GlycoPAMAM dendrimers. » *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 11-17; b) E. Kolomiets, E. M. V. Johansson, O. Renaudet, T. Darbre, J.-L. Reymond. « Neoglycopeptide Dendrimer Libraries as a Source of Lectin Binding Ligands. » *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1465-1468.

<sup>143</sup> I. Baussanne, J. M. Benito, C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, J. Defaye. « Dependence of Concanavalin A Binding on Anomeric Configuration, Linkage Type, and Ligand Multiplicity for Thiourea-Bridged Mannopyranosyl- $\beta$ -Cyclodextrin Conjugates. » *ChemBioChem* **2001**, *2*, 777-783.

<sup>144</sup> L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro. « Calixarene-based Multivalent Ligands. » *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266.

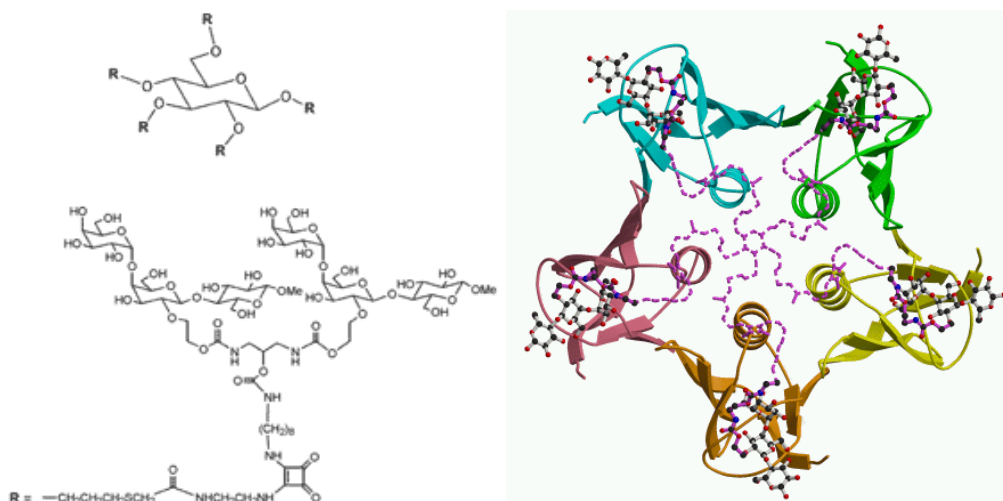
<sup>145</sup> R. Ballardini, B. Colonna, M. T. Gandolfi, S. A. Kalovidouris, L. Orzel, F. M. Raymo, J. F. Stoddart. « Porphyrin-Containing Glycodendrimers. » *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 288-294.

<sup>146</sup> M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling. « Varying the Size of Multivalent Ligands: The Dependence of Concanavalin A Inhibition on Neoglycopolymer Length. » *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932.

<sup>147</sup> G. Ragupathi, F. Koide, P. O. Livingston, Y. S. Cho, A. Endo, Q. Wan, M. K. Spassova, S. J. Keding, J. Allen, O. Ouerfelli, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky. « Preparation and Evaluation of Unimolecular Pentavalent and Hexavalent Antigenic Constructs Targeting Prostate and Breast Cancer: A Synthetic Route to Anticancer Vaccine Candidates. » *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2715-2725.

<sup>148</sup> A. Dondoni, A. Marra. « C-Glycoside Clustering on Calix[4]arene, Adamantane, and Benzene Scaffolds through 1,2,3-Triazole Linkers. » *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546-7557.

<sup>149</sup> M. Köhn, J. M. Benito, C. O. Mellet, T. K. Lindhorst, J. M. G. Fernández. « Functional Evaluation of Carbohydrate-Centred Glycoclusters by Enzyme-Linked Lectin Assay: Ligands for Concanavalin A. » *ChemBioChem* **2004**, *5*, 771-777.



**Figure 67** : Structure du ligand multivalent StarFish (gauche) et reconnaissance du StarFish sur la toxine (droite).

En effet, cette molécule, appelée StarFish et présentant plusieurs trisaccharide P<sup>k</sup> (Fig. 67) est l'un des inhibiteurs de la toxine du choléra le plus connu. Ce ligand permet d'occuper les cinq sites de reconnaissance de la protéine et présente ainsi un IC<sub>50</sub> particulièrement bas (< nM)<sup>150</sup>.

### 1.3.3 Mécanisme des interactions multivalentes :

Le groupe de Kiessling a récemment réalisé une étude visant à comprendre les facteurs qui influent sur les différents mécanismes d'interaction multivalente entre des sucres et des lectines. Cette étude portant sur des ligands multivalents différents et la ConA a confirmé l'influence de leur caractéristique structurale sur le mécanisme de reconnaissance. Au cours de cette étude, elle a montré que les ligands multivalents peuvent interagir avec leurs récepteurs de diverses manières comme on peut le voir sur la figure 68. Les interactions multivalentes peuvent donc avoir lieu sur des sites de liaisons multiples (a), avoir lieu sur au niveau des sites de liaison primaires et secondaires (b), induire le rapprochement des récepteurs (cluster, c), permettre d'augmenter l'affinité en augmentant la concentration locale en ligands (d), et avoir un effet statistique de proximité (e)<sup>151</sup>.

<sup>150</sup> P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. j. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle. « Shiga-like Toxins are Neutralized by Tailored Multivalent Carbohydrate Ligands. » *Nature* **2000**, *403*, 669-672.

<sup>151</sup> a) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling. « Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. » *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933; b) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong. « Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 2348-2368.

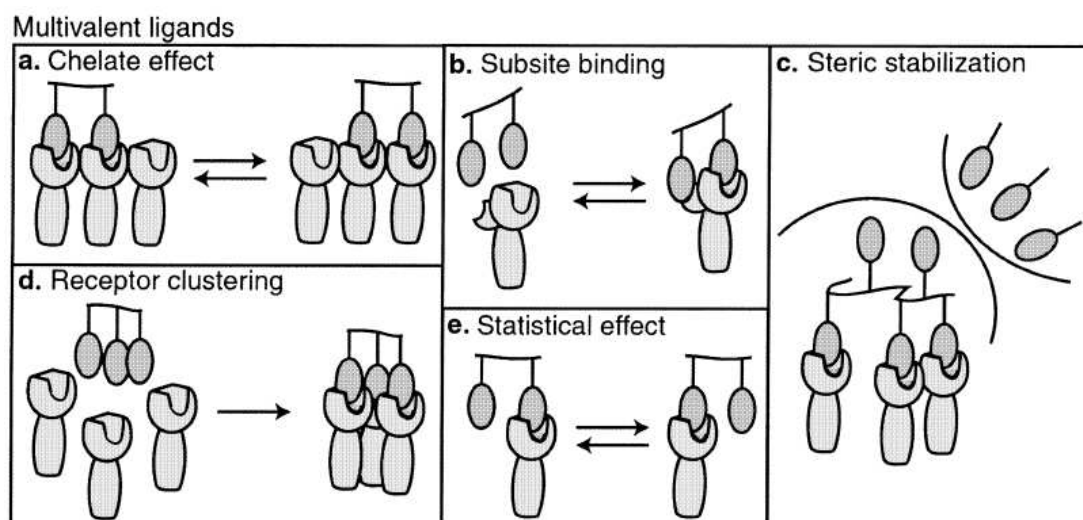


Figure 68 : Types d'interactions polyvalentes.

Néanmoins, cette étude reflète clairement la difficulté pour établir les relations entre l'architecture d'un ligand multivalent et son mode de reconnaissance envers un récepteur. En effet, les interactions multiples sont complexes et ne sont pas encore entièrement comprises à ce jour.

### 1.3.4 Hétéroglycoclusters :

Il a été montré que plusieurs sucres peuvent être impliqués dans un même processus de reconnaissance. Cette observation a très récemment été l'objet d'études originales portant sur le design et la synthèse d'hétéroglycoclusters.<sup>152</sup> Des ligands trivalents comportant plusieurs sucres différents ont été synthétisés en utilisant des protections orthogonales sur le châssis. En particulier, Fernandez *et coll.* ont synthétisés des cyclodextrines présentant des motifs  $\alpha$ -mannose,  $\beta$ -glucose, et  $\beta$ -lactose sous forme de structure à 7, 14 ou 21 branches<sup>66</sup> (Fig. 69). Ces cyclodextrines à 21 branches peuvent présenter par exemple 14 mannoses et 7 glucose (produit 9 sur la figure 69) ou 14 mannoses et 7 lactoses (produit 10 sur la figure 69). L'affinité de ces hétéroclusters a été testée sur la Concanavaleine A. Les résultats montrent que la reconnaissance est meilleure lorsque les mannoses sont représentés sous forme d'une triade (composé 4). D'autre part, les hétéroglycoclusters  $\alpha$ -Man/ $\beta$ -Glu (7 et 9) et  $\alpha$ -Man/ $\beta$ -Lac (8 et 10) montrent une meilleure affinité que les homoglycoclusters correspondant au même nombre de mannoses (2 ou 3). On peut donc supposer que l'orientation des ligands ainsi que

<sup>152</sup> a) J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lonnberg. « An Orthogonally Protected  $\rho,\rho$  Bis(aminomethyl)- $\hat{\alpha}$ -alanine Building Block for the Construction of Glycoconjugates on a Solid Support . » *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001; b) A. Patel, T. K. Lindhorst. « Synthesis of "Mixed Type" Oligosaccharide Mimetics Based on a Carbohydrate Scaffold. » *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 79-86.

les interactions secondaires proche du site de reconnaissance jouent un rôle décisif dans la force d'interaction et dans la sélectivité entre une lectine et son ligand<sup>151,153</sup>.

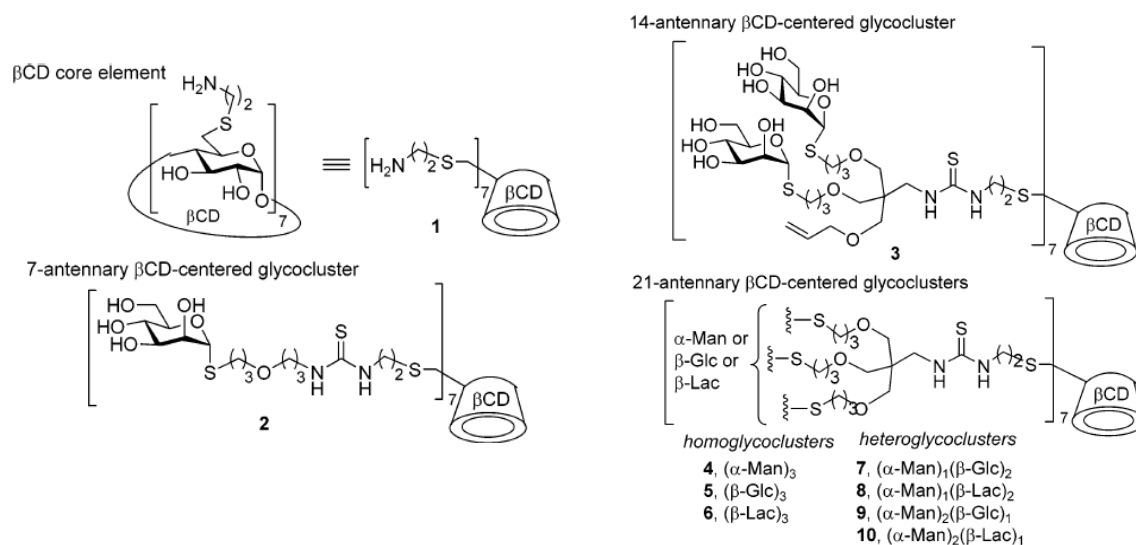


Figure 69 : Structure des cyclodextrines multivalentes synthétisées.

C'est sur ce dernier point que nous avons orienté notre étude.

#### 1.4 Etudes déjà réalisées au laboratoire :

Au laboratoire, un grand nombre de molécules multivalentes a été synthétisé dans le but d'étudier et d'évaluer *in vitro* le potentiel de reconnaissance de ces composés avec différentes lectines (Fig. 70). Des expériences d'inhibition de type Enzyme Like Lectin Assay (ELLA) ont été réalisées. Nous reviendrons sur le principe de ces études au paragraphe 5. Le potentiel de reconnaissance des systèmes tétravalents a notamment été mesuré puis comparé au RAFT monovalent, ce qui a permis de confirmer l'exaltation de la reconnaissance par la multivalence. D'autre part, la comparaison de l'effet du RAFT avec celui d'un système de présentation classique (dendrimère tétravalent MAP) a validé l'intérêt du RAFT comme plateforme présentatrice de motifs osidiques.

De plus, ces études ont permis de mettre en évidence que les systèmes RAFT(αMan)<sub>16</sub>/ConA et RAFT(αFuc)<sub>4</sub>/PAIIL (lectine produite par le groupe de glycobiologie dirigé par A. Imberty, CERMAV, Grenoble) présentent un IC<sub>50</sub> allant du micromolaire au nanomolaire (2 et 0.02 μM respectivement).

<sup>153</sup> E. K. Soller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger. « Altering the Strength of Lectin Binding Interactions and Controlling the Amount of Lectin Clustering using Mannose/hydroxyl-functionalized Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8820-8826.

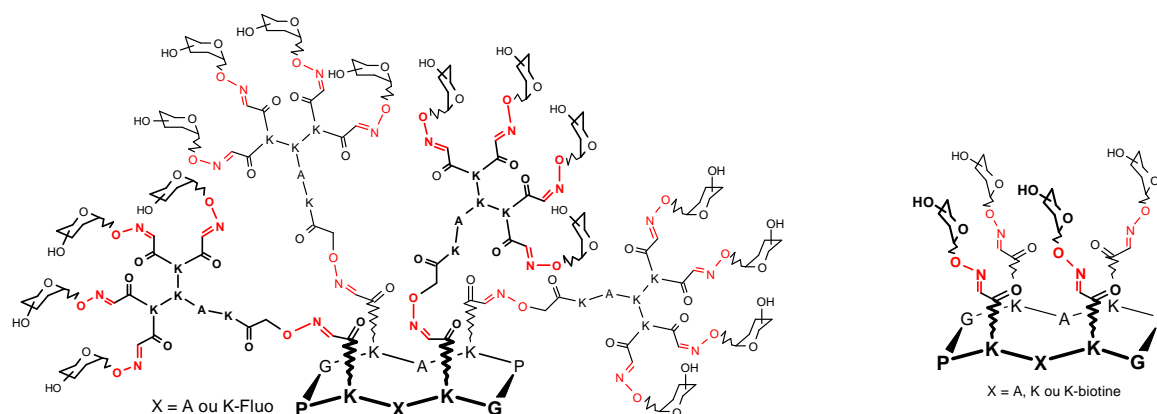


Figure 70 : Exemple de molécules multivalentes réalisées au laboratoire.

## 2. Projet :

A partir des travaux réalisés au laboratoire et ceux décrits dans la littérature, nous avons développé une stratégie d'assemblage combinatoire en solution de nouveaux ligands multivalents sous la forme d'hétéroclusters. Le but de cette étude est de développer une méthodologie efficace qui permette d'accéder d'une manière simple et rapide à des mélanges de glycoclusters. Ces composés seront formés à partir d'oligosaccharides auxquels nous associerons des d'acides aminés de différente nature afin d'évaluer l'influence de la présence de charges ou de résidus hydrophobes à proximité du site de liaison principal (sites d'interactions secondaires). L'approche que nous proposons consiste à réaliser un assemblage combinatoire et chimiosélectif de ces sucres et acides aminés sur la matrice RAFT. Pour valider la faisabilité de cette nouvelle approche, nous nous sommes intéressés aux interactions largement documentées entre le mannose et la ConA.

### 2.1 Démarche proposée :

Cette approche repose sur l'utilisation de la ligation oxime selon un principe combinatoire (Fig. 71). L'utilisation d'un mélange biomolécules possédant une fonction oxyamine en présence d'un châssis peptidique fonctionnalisé par quatre aldéhydes permettra d'obtenir des bibliothèques de ligands potentiels qui différeront par leur composition et la position relative de chaque motif de reconnaissance. Les composés possédant le potentiel biologique recherché seront sélectionnés par des tests simples afin d'obtenir une réponse rapide. Ceci sera entrepris en utilisant des colonnes d'affinité greffées avec la Concanavaline A.

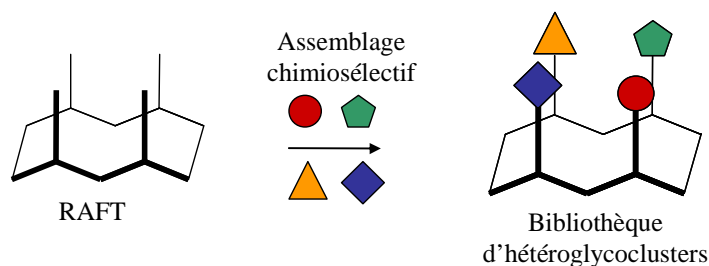


Figure 71 : Stratégie d'assemblage.

## 2.2 Aspects théoriques de notre approche :

Ce sont les règles des probabilités qui vont nous donner le nombre de produits et les combinaisons formés dans nos bibliothèques. En effet, nous avons choisi d'utiliser 4 biomolécules « n » susceptibles de s'accrocher sur 4 sites d'ancrage « p », ce qui devrait donner  $4^4$  soit 256 molécules au final ( $p^n$ ). Cette formule est valable si les 4 sites d'ancrage ne sont pas équivalents, or le RAFT utilisé présente une symétrie C2 qui permet d'obtenir seulement 136 (sites 2 à 2 équivalents). En effet, des produits seront considérés comme isomères de positions et non pas comme différents. Pour faciliter la déconvolution lors des tests biologiques et ainsi identifier chaque produit des mélanges, nous avons également préparé 14 sous-bibliothèques qui représentent des sous ensembles de la bibliothèque principale :

- 4 sous-bibliothèques composées d'un 1 seul ligand.
- 6 sous-bibliothèques composées des mélanges à 2 ligands.
- 4 sous-bibliothèques composées des mélanges à 3 ligands.
- 1 bibliothèque principale comprenant les 14 sous-bibliothèques.

Le tout est de savoir si l'ordre a une importance ou non pour faire la différence entre les notions d'arrangement et de combinaison. Un arrangement  $A_n^p$  répond à la question de savoir combien il y a de groupes ordonnés de p éléments parmi n différents.

**Définition :** E étant un ensemble à n éléments, on appelle arrangement de p éléments de E toute p-liste d'éléments distincts de E. La formule générale d'un arrangement est la

suivante : 
$$A_n^p = \frac{n!}{(n-p)!}$$

Cette formule s'établit par un raisonnement élémentaire. Pour le premier élément qu'on choisit, on a n choix. Pour le deuxième élément, on a n-1 choix, etc...



Pour une combinaison, l'ordre est indifférent. Si on a une combinaison de p éléments, on peut les classer de p! manières différentes.

**Définition :** E étant un ensemble à n éléments, on appelle combinaison de p éléments de E toute collection non ordonnée de p éléments distincts de E, ie toute partie de E à p éléments.

Le nombre de combinaisons de p éléments parmi n  $C_n^p$  vérifie donc  $C_n^p \cdot p! = A_n^p$ . Ceci

donne : 
$$C_n^p = \frac{n!}{p!(n-p)!}$$

Lors de la formation de nos bibliothèques et de nos sous-bibliothèques nous avons plusieurs combinaisons possibles (1, 2, 3 ou 4 ligands). Parmi celles-ci on a également plusieurs combinaisons et arrangements possibles (disposition des ligands, nombre de ligands équivalents)

Dénombrement du nombre de possibilité :

- ⇒ 4 ligands ≠ sur 4 sites
- ⇒ 3 ligands ≠ sur 4 sites (2 sites portent le même ligand)
- ⇒ 2 ligands ≠ sur 4 sites (2 ou 3 sites portent le même ligand)
- ⇒ 1 ligands ≠ sur 4 sites (les 4 sites portent le même ligand)

Les formules permettant de calculer le nombre de possibilités pour chaque ensemble est décrit en annexe.

Nous pouvons en déduire une formule générale selon le nombre de ligands utilisés :

**Nombre d'arrangement à n ligands sur 4 sites :**

$$N = 24C_n^4 + 36C_n^3 + 14C_n^2 + C_n^1$$

Pour n=4 ligands, N= 24 + 144 + 84 + 4 =256

Pour n=5 ligands, N=24x5+36x10+14x10+5=625

*Cas où les sites sont 2 à 2 équivalents (1 ↔ 3 et 2 ↔ 4, symétrie C2)*

$$N_{sym} = 12C_n^4 + 18C_n^3 + 8C_n^2 + C_n^1$$

**Pour n =4 ligands, N= 12 + 72 + 48 + 4 =136**

Les valeurs obtenues pour chaque cas sont représentées dans la figure ci-dessous.

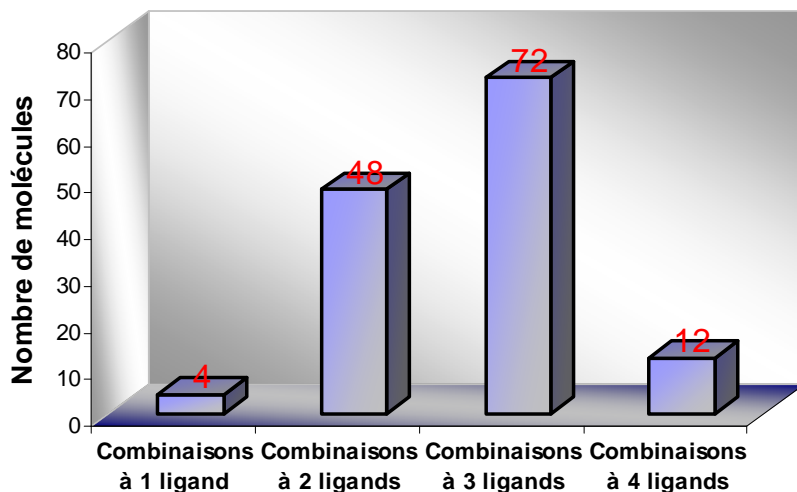


Figure 72 : Nombre de molécules formées à partir de 1, 2, 3 ou 4 ligands.

En résumé, le mélange global de 136 molécules peut être subdivisé en quatre sous ensembles selon les combinaisons suivantes (avec a, b, c et d les 4 types de ligands possibles) :

- Un sous ensemble comprenant **4** molécules présentant 1 seul type de ligands: RAFT [a]
- Un sous ensemble comprenant **48** molécules présentant 2 ligands différents : RAFT [a][b]
- Un sous ensemble comprenant **72** molécules présentant 3 ligands différents : RAFT [a][b][c]
- Un sous ensemble comprenant **12** molécules présentant 4 ligands différents : RAFT [a][b][c][d]

Plus précisément

- En prenant le mélange du RAFT avec un seul des 4 ligands, on obtient donc seulement **1** produit correspondant au RAFT avec 4 ligands identiques sur ces 4 sites.
- En prenant un mélange du RAFT avec deux des quatre ligands, on obtient donc **10** produits : 2 produits correspondant au RAFT avec 4 ligands identiques, 4 produits correspondant aux ligands disposés de façon 2+2 et 4 produits correspondant aux ligands disposés de façon 1+3.
- En prenant un mélange du RAFT avec 3 ligands, on obtient un mélange de **45** produits. Des produits correspondant aux trois sous ensembles résultant de l'assemblage de 2 ligands (27 produits) ainsi que 18 nouveaux produits correspondant au RAFT avec 3 ligands différents. En effet il est possible d'avoir 3 types de combinaison : RAFT ([a]<sub>2</sub>[b][c]), RAFT ([a][b]<sub>2</sub>[c]), RAFT ([a][b][c]<sub>2</sub>), possédant chacun 6 isomères de positions, ce qui donne 18 molécules.

→ En prenant le mélange du RAFT avec les 4 ligands, on obtient 136 molécules constituées des 14 sous-bibliothèques et de 12 molécules (isomères de position) présentant les 4 ligands différents sur le RAFT.

### 3. Mis au point de la méthode d'assemblage :

La première partie du travail a concerné la mise au point de la procédure. Pour cela, il a fallu trouver les conditions opératoires optimales pour former les ligands de manière efficace, ainsi qu'un moyen de purification permettant de conserver la distribution des produits de la bibliothèque.

#### 3.1 Mis au point des conditions de la réaction :

Nous avons mis au point les conditions opératoires à l'aide des peptides modèles **7**, **8**, **9** et **10**. Il a tout d'abord fallu déterminer et affiner la stoechiométrie nécessaire afin de former un mélange qui respecte les lois de probabilités, en supposant que ces peptides possèdent une réactivité équivalente. Nous avons finalement utilisé pour chaque bibliothèque ou sous-bibliothèque synthétisées un total de 12 équivalents en peptide oxyamine (ici peptides **7**, **8**, **9** ou **10**). Pour un mélange comportant 1 peptide, on utilise donc 12 équivalents de celui-ci et pour mélange comportant 2 peptides, on utilise 6 équivalents de chaque. Pour la réalisation de ces bibliothèques, nous ajoutons à une solution de RAFT (10mg/mL dans l'eau), une solution d'un mélange de peptides (10mg/mL) ainsi que 10% d'acide acétique afin de se trouver en milieu légèrement acide. Chaque mélange a été analysé par CLHP. On peut noter la présence du peptide oxyamine en excès ainsi que celle des produits appartenant à notre bibliothèque (Fig. 73).

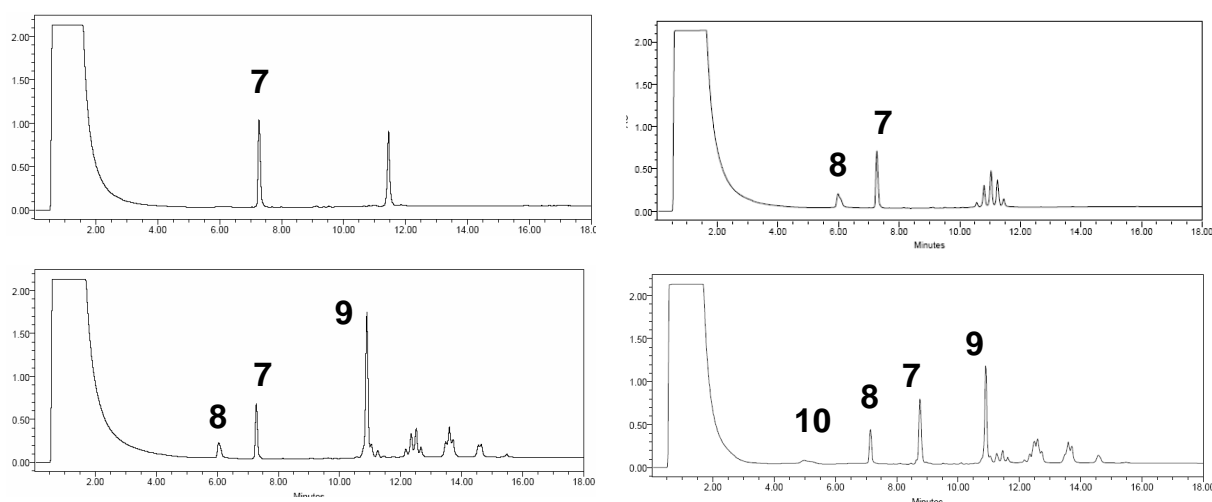


Figure 73 : Chromatogramme CLHP des 4 types de bibliothèques (Gradient 5-100% B en 15 minutes).

### 3.2 Purification des mélanges :

Une fois l'assemblage terminé, il nous faut éliminer l'excès de biomolécules oxyamine qui n'a pas réagi. Nous devons utiliser une méthode permettant d'éliminer cet excès sans biaiser la composition du mélange, cette nécessité ne permet pas par exemple d'utiliser la CLHP comme moyen de purification. En effet, certains produits pourraient avoir des temps de rétention similaires ou proches de ceux des produits à éliminer, ce qui rendrait la purification difficile voire impossible. Nous avons montré que l'utilisation de supports fonctionnalisés aldéhyde semble représenter la meilleure stratégie. Tout d'abord, nous avons utilisé des lanternes fonctionnalisées<sup>154</sup> dont le principe d'utilisation est très simple (Fig. 74).

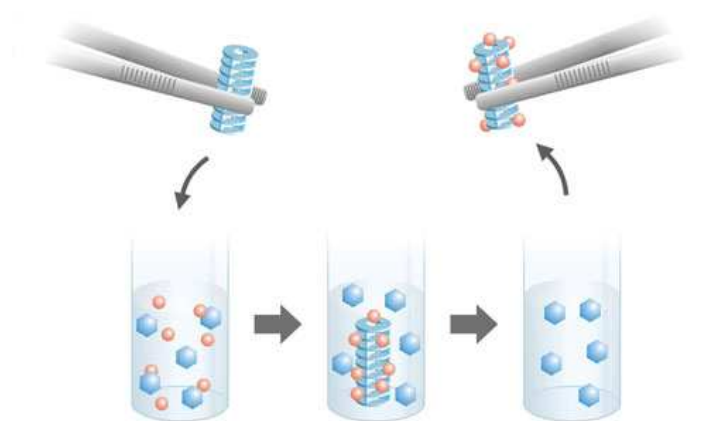
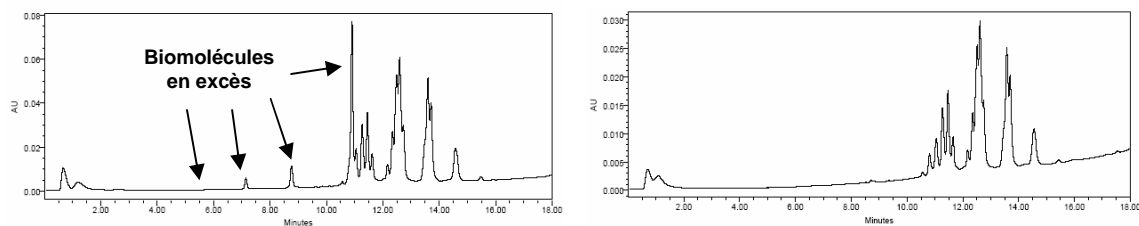


Figure 74 : Principe d'utilisation des lanternes Mimotopes.

Il suffit de mettre les lanternes fonctionnalisées dans la solution contenant les produits indésirables et de laisser réagir puis de les retirer. Malheureusement, celles-ci ne sont pas adaptées aux conditions aqueuses utilisées pour former nos mélanges. C'est pourquoi nous avons choisi une méthode de purification sur gel d'agarose fonctionnalisé par des fonctions aldéhydes. Nous mettons en présence une quantité de gel correspondant à deux fois le nombre d'équivalents de peptides mis en jeu (calculé à partir du taux de chargement du gel) puis nous laissons sous agitation légère pendant 6 heures. Ensuite le mélange est filtré sur coton et le filtrat correspond à notre mélange purifié.

<sup>154</sup> Développées par la société Mimotopes.

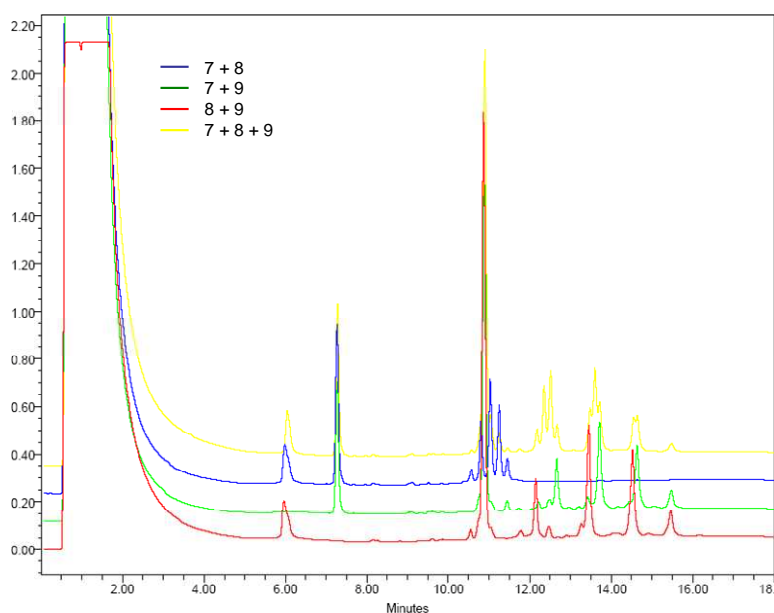


**Figure 75 :** Profil CLHP d'un mélange avant (gauche) et après (droite) purification par gel aldéhyde (Gradient 5-100% B en 15 minutes).

Les chromatogrammes obtenus montrent très clairement l'efficacité de la méthode puisque seuls les pics correspondant à l'excès de peptides oxyamines ont disparus. L'allure du chromatogramme correspondant à la bibliothèque reste identique après cette opération (Fig. 75).

### 3.3 Caractérisation des mélanges :

Dans la plupart des cas, les chromatogrammes obtenus sont bien résolus et la simple superposition des sous-bibliothèques et bibliothèque principale permet d'identifier assez facilement chacun des pics des mélanges, comme on le voit sur l'exemple de la figure 76.



**Figure 76 :** Superposition des différentes sous-bibliothèques comprises dans la sous-bibliothèque à 3 peptides (Gradient 5-100% B en 15 minutes).

Dans cet exemple, la superposition des sous-bibliothèques à 2 peptides comprises dans la sous-bibliothèque à 3 peptides, permet d'attribuer chaque pic du chromatogramme (Fig. 77). Grâce à cette méthode, nous parvenons également à identifier les 3 pics correspondant aux

nouveaux produits de la bibliothèque à 3 peptides (Fig. 77). Cette méthode sera plus largement développée dans le paragraphe 4.4.

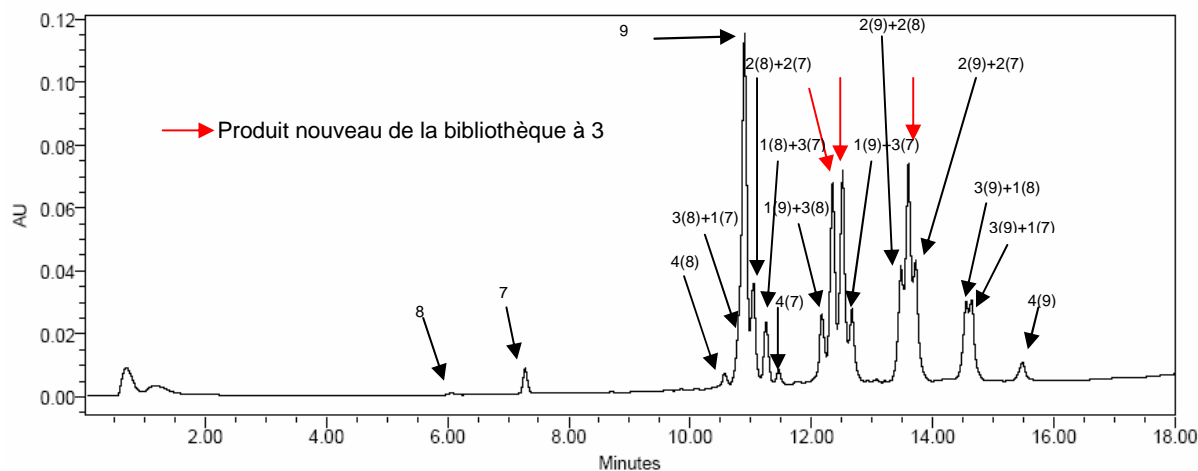


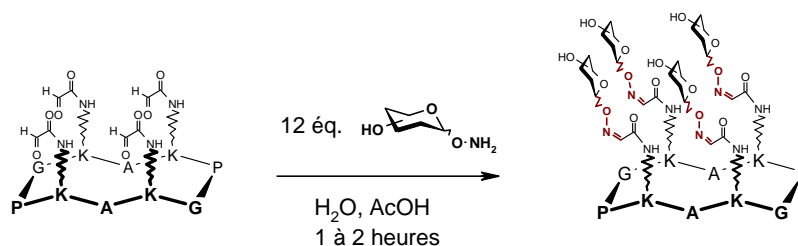
Figure 77 : Identification des pics d'une sous-bibliothèque (Gradient 5-100% B en 15 minutes).

#### 4. Synthèses des bibliothèques d'hétéroglycoclusters :

En utilisant la méthode d'assemblage précédemment décrite, nous avons préparés différentes bibliothèques d'hétéroglycoclusters. Nous avons assemblés de façon aléatoire quatre biomolécules (sucres ou acides aminés) sur la face supérieur du RAFT pour former les bibliothèques et sous-bibliothèques correspondantes.

##### 4.1 Bibliothèque constituée uniquement d'oligosaccharides :

Nous avons dans un premier temps utilisé les 4 motifs saccharidiques  $\alpha$ -mannose,  $\alpha$ -GalNAc,  $\alpha$ -fucose et  $\beta$ -lactose dont nous avons décrit la synthèse au chapitre I (Fig. 78). Nous procédons de la manière décrite dans la partie 3.1, c'est-à-dire que nous utilisons un total de 12 équivalents en sucres pour chaque mélange. Les mélanges sont réalisés en ajoutant à une solution de RAFT dans l'eau (10mg/mL) une solution d'un mélange de sucres dans l'eau (20mg/mL) ainsi que 10% d'acide acétique.



Lib.	Ligands	Arrangement (number of regioisomers)	Tot.
A	Man 29 + Lac 46	Man(1) + ManLac(2) + ManLacLac(4) + ManLacLacLac(2) + ManLacLacLacLac(1)	10
B	Man 29 + GalNac 40	Man(1) + ManGalNac(2) + ManGalNacLac(4) + ManGalNacLacLac(2) + ManGalNacLacLacLac(1)	10
C	Man 29 + Fuc 58	Man(1) + ManFuc(2) + ManFucLac(4) + ManFucLacLac(2) + ManFucLacLacLac(1)	10
D	Lac 46 + GalNac 40	Lac(1) + LacGalNac(2) + LacGalNacLac(4) + LacGalNacLacLac(2) + LacGalNacLacLacLac(1)	10
E	Lac 46 + Fuc 58	Lac(1) + LacFuc(2) + LacFucLac(4) + LacFucLacLac(2) + LacFucLacLacLac(1)	10
F	GalNac 40 + Fuc 58	GalNac(1) + GalNacFuc(2) + GalNacFucLac(4) + GalNacFucLacLac(2) + GalNacFucLacLacLac(1)	10
G	Man 29 + Lac 46 + GalNac 40	Libraries A + B + D + ManLacGalNac(6) + ManLacFuc(6) + ManGalNacFuc(6)	45
H	Man 29 + Lac 46 + Fuc 58	Libraries A + C + E + ManLacFuc(6) + ManLacFucLac(6) + ManFucLacLac(6)	45
I	Man 29 + GalNac 40 + Fuc 58	Libraries B + C + F + ManGalNacFuc(6) + ManGalNacFucLac(6) + ManFucLacLac(6)	45
J	Lac 46 + GalNac 40 + Fuc 58	Libraries D + E + F + LacGalNacFuc(6) + LacGalNacFucLac(6) + LacFucLacLac(6)	45
K	Man 29 + Lac 46 + GalNac 40 + Fuc 58	Libraries A + B + C + D + E + F + G + H + I + J + ManLacGalNacFuc(12)	136

■ = Man 29; ◆ = Lac 46; ● = GalNac 40; ■ = Fuc 58

Figure 78 : Assemblage chimiosélectif et combinatoire des 4 sucres oxyamines sur le RAFT-aldéhyde.

Il faut noter que les sucres utilisés en excès ne sont pas détectés en CLHP à 214 nm, c'est pourquoi nous visualisons seulement les molécules finales et non les excès de sucres sur les chromatogrammes (Fig. 79).

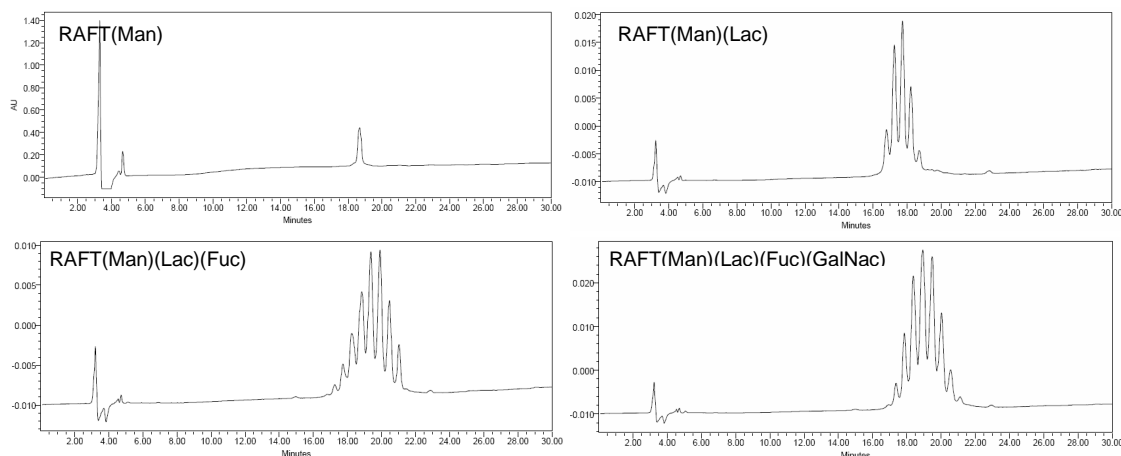


Figure 79 : Chromatogrammes CLHP de différentes sous-bibliothèques obtenus (Gradient 5-40% B en 15 minutes).

Les réactions sont rapides, propres comme le montrent les chromatogrammes. Par contre, on s'aperçoit que pour les mélanges à 3 et 4, on n'obtient pas le nombre de pics attendu. Ceci vient du caractère hydrophile comparable de chaque composé qui ne permet pas de séparer chaque pic correspondant en CLHP. Cet aspect représente un inconvénient et une limite à

l'étude de ces mélanges à 3 ou 4 sucres différents. L'excès de sucres oxyamine est éliminé en utilisant le gel aldéhyde selon procédure décrite pour les peptides modèles.

L'ensemble des produits a été caractérisé par spectrométrie de masse (MALDI). Les spectres obtenus confirment la présence de chaque espèce attendue. Ils présentent des pics de masse correspondant généralement aux adduits avec des ions sodium ou potassiums (Fig. 80).

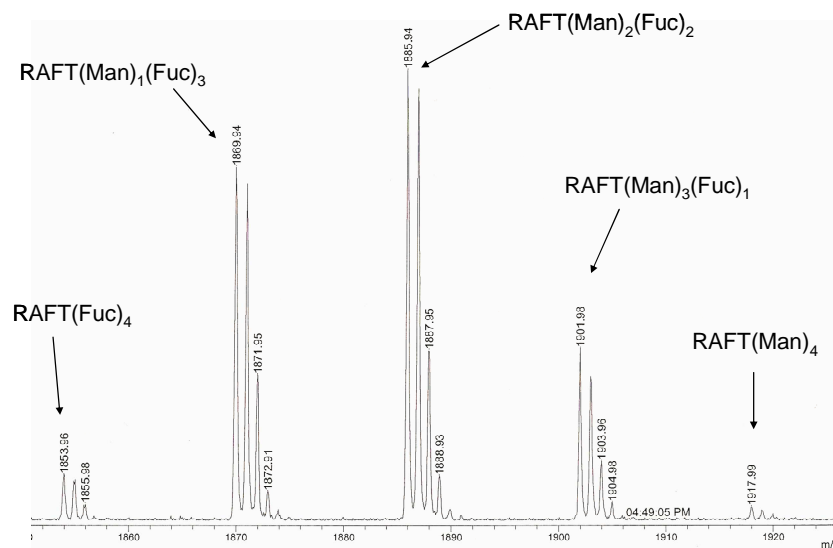


Figure 80 : Spectre de masse (MALDI) d'une sous-bibliothèque à 2 sucres : RAFT(Man)(Fuc) (librairie C).

#### 4.2 Bibliothèque constituée d'oligosaccharides et d'acides aminés :

Nous nous sommes ensuite intéressés à créer des hétéroglycoclusters en associant des acides aminés de différentes natures avec des sucres. On espère ainsi renforcer l'affinité ou la sélectivité de nos ligands vis-à-vis de leur cible grâce à des sites d'interactions secondaires situés en périphérie du site de reconnaissance principal par le biais des chaînes latérales de ces acides aminés (interaction hydrophobe, liaison hydrogène).

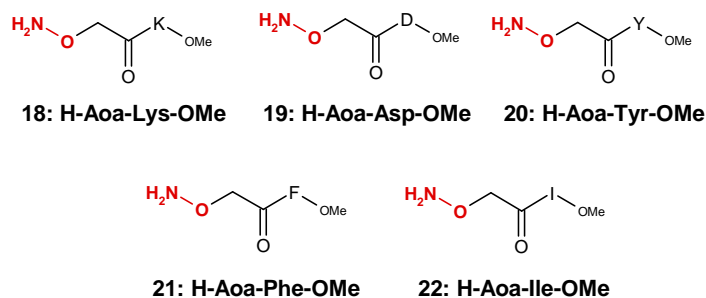
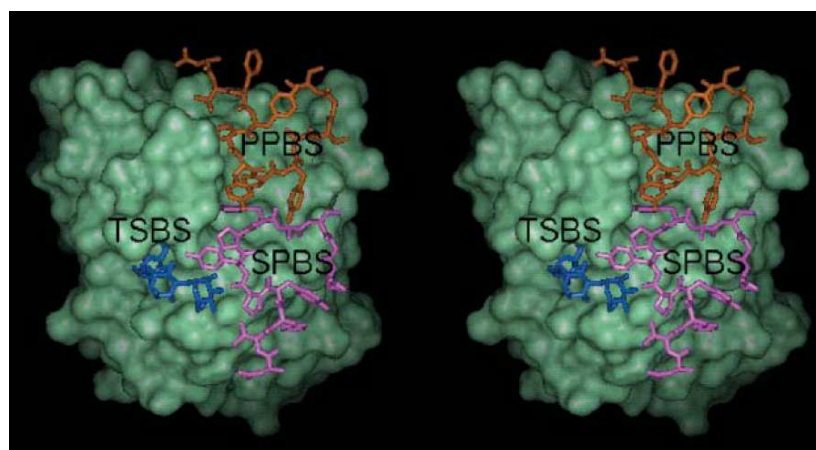


Figure 81 : Acides aminés incorporés dans les mélanges de sucres.



C'est pourquoi nous avons choisi des résidus qui comportent des fonctions différentes : hydrophobes (Tyrosine, Phénylalanine, Isoleucine), chargés positivement (Lysine) et négativement (Acide aspartique) (Fig. 81). Il est en effet maintenant connu que les sites de reconnaissance de certaines lectines contiennent des poches hydrophobes formées par la présence de dérivés aromatiques. Dans de nombreux cas, la présence de résidus hydrophobes améliore la reconnaissance du sucre par la lectine, ce qui indique que la poche d'interaction est elle-même hydrophobe ou des sites proches de celui de reconnaissance du sucre le sont. Dans l'exemple qui nous intéresse, il a été montré à partir de la structure au rayons X du complexe ConA/mannose en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  que non seulement l'acide aspartique 208, l'asparagine 14 et l'arginine 228 sont impliqués dans la liaison du sucre mais également que la tyrosine 100 peut intervenir pour stabiliser le complexe<sup>155</sup>. En particulier, deux groupes ont montré que des peptides peuvent se lier avec la ConA<sup>156</sup>.



**Figure 82** : Structure du complexe peptide-ConA. Vue de la surface de la ConA ainsi que le site de reconnaissance du peptide loin du site à mannose (PPBS, orange), proche du site à mannose (SPBS, rose) et celui du trimannose (bleu).

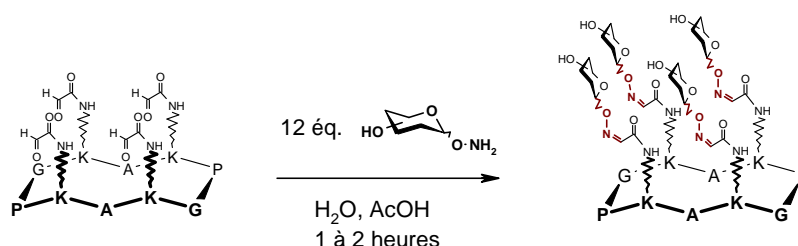
En utilisant une bibliothèque d'hexapeptides générée par « phage display », Goldstein a identifié une séquence consensus Y-P-Y capable d'interaction spécifique avec la ConA. Il a également été montré que cette lectine reconnaît avec une plus grande affinité le phényl  $\alpha$ -D-mannopyrannoside que l' $\alpha$ -D-mannopyrannoside, suggérant l'implication d'acides aminés capables d'interactions hydrophobes à l'intérieur ou proche du site de reconnaissance du mannose. Cette hypothèse a été confirmée lorsque la ConA fut cocristallisé en présence du

<sup>155</sup> V. Sharma, A. Surolia. « Analyses of Carbohydrate Recognition by Legume Lectins: Size of the Combining Site Loops and their Primary Specificity. » *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 433-445.

<sup>156</sup> a) J. K. Scott, D. Loganathan, R. B. Easley, X. Gong, I. J. Goldstein. « A Family of Concanavalin A-Binding Peptides from a Hexapeptide Epitope Library. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 5398-5402; b) K. J. Kaur, S. Khurana, D. M. Salunke. « Topological Analysis of the Functional Mimicry between a Peptide and a Carbohydrate Moiety. » *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 5539-5543.

peptide DVFYYPYASGS. Il fut en effet observé deux sites de reconnaissances de ce peptide. Le premier site est situé dans une poche indépendante du site de reconnaissance du mannose. Le second est situé très proche du site du mannose et permet au peptide d'interagir grâce principalement à des interactions hydrophobes (Fig. 82). Lorsque les tyrosines sont remplacées dans la séquence par des phénylalanines, l'affinité diminue légèrement. Si on les remplace par des sérines, l'affinité devient alors quasi nulle, confirmant ainsi l'importance des résidus hydrophobes dans cette interaction.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes appuyés sur ces travaux pour choisir les différents acides aminés associés au mannose. Nous avons choisi des chaînes latérales hydrophobes et des acides aminés chargés positivement (Lysine) et négativement (Acide aspartique) pour évaluer l'influence des résidus hydrophobes dans la reconnaissance avec la ConA. Pour des raisons de facilité, nous nous sommes limités aux mélanges à deux ligands dans cette étude (Fig. 83).

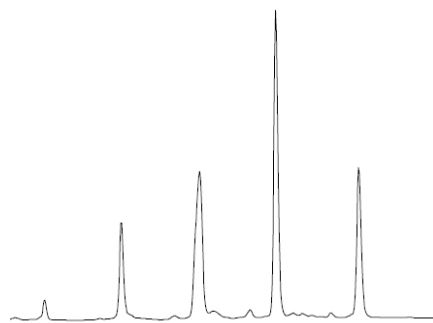


Lib.	Ligands	Arrangement (number of regioisomers)	Tot.
L	Man 29 + Tyr 20	Man (1) + Man-Tyr (2) + Man-Tyr-Tyr (4) + Man-Tyr-Tyr-Tyr (2) + Tyr-Tyr-Tyr-Tyr (1)	10
M	Man 29 + Lys 18	Man (1) + Man-Lys (2) + Man-Lys-Lys (4) + Man-Lys-Lys-Lys (2) + Lys-Lys-Lys-Lys (1)	10
N	Man 29 + Asp 19	Man (1) + Man-Asp (2) + Man-Asp-Asp (4) + Man-Asp-Asp-Asp (2) + Asp-Asp-Asp-Asp (1)	10
O	Man 29 + Ile 22	Man (1) + Man-Ile (2) + Man-Ile-Ile (4) + Man-Ile-Ile-Ile (2) + Ile-Ile-Ile-Ile (1)	10
P	Man 29 + Phe 21	Man (1) + Man-Phe (2) + Man-Phe-Phe (4) + Man-Phe-Phe-Phe (2) + Phe-Phe-Phe-Phe (1)	10

Man 29 = ; Tyr 20 = ; Lys 18 = ; Asp 19 = ; Ile 22 = ; Phe 21 = .

**Figure 83** : Assemblage chimiosélectif et combinatoire des Acides aminés et du mannose oxyamines sur le RAFT-aldéhyde.

Il faut noter que dans certains cas, il a été nécessaire de changer la stoechiométrie ainsi que le nombre d'équivalents des 2 ligands afin d'obtenir un mélange comportant tous les composés souhaités. Ceci est certainement dû à la différence de vitesse de réactivité entre les 2 composés oxyamines qui ne sont pas exactement de même nature (peptidique et saccharidique). Ces réglages ont été nécessaires notamment pour les mélanges comportant l'acide aspartique et la lysine.



**Figure 84 :** Profil de la librairie **L** (Gradient 5-100% B en 15 minutes).

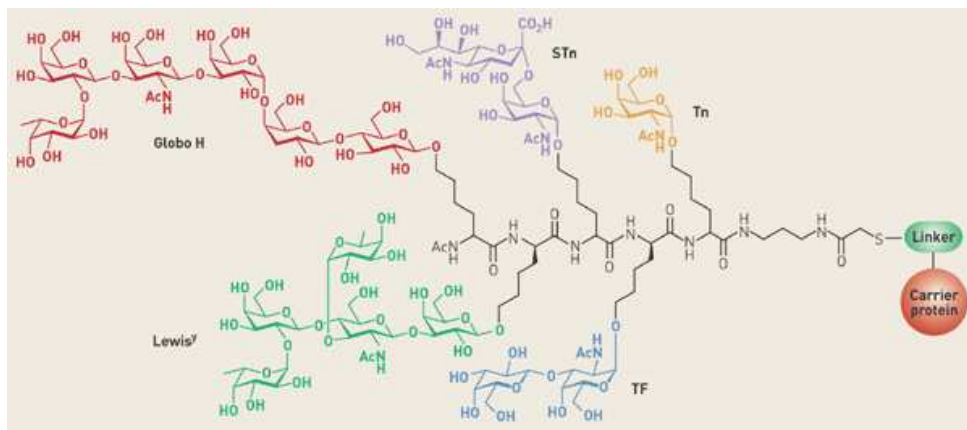
L'ensemble des produits a été caractérisé par spectrométrie de masse (MALDI). Les spectres obtenus présentent des pics de masse confirmant ici encore la présence de chaque élément de la bibliothèque.

### 4.3 Bibliothèque de vaccins multiépitopiques :

De nombreuses pathologies sont associées à des modifications structurales spectaculaires de la surface cellulaire. Il a notamment été montré que des glycoconjugués membranaires particuliers sont caractéristiques des cellules impliquées dans les maladies auto-immunes, les maladies infectieuses ou les cancers. Ces changements structuraux s'opèrent aussi bien sur la partie saccharidique des protéines que des lipides membranaires. Ils se manifestent par des glycosylations dites «aberrantes» correspondant souvent à des surexpressions de motifs déjà existants ou à l'apparition de structures inhabituelles : on les appelle antigènes tumoraux. A l'heure actuelle, les vaccins chimiques constituent l'une des perspectives thérapeutiques antitumorales les plus prometteuses. De nombreuses études tendent à se diriger vers la préparation de candidats vaccins multiépitopiques dont les oligosaccharides marqueurs de tumeurs constituent les éléments structuraux essentiels. Il a très récemment été montré par Danishefsky<sup>157</sup> que la construction de glycoconjugués contenant des mélanges d'antigènes tumoraux saccharidiques (Ex : Tn, T), exposés à la surface d'une molécule porteuse immunogène (KLH ou BSA) permet d'élargir le spectre d'activité des vaccins synthétiques (Fig. 85).

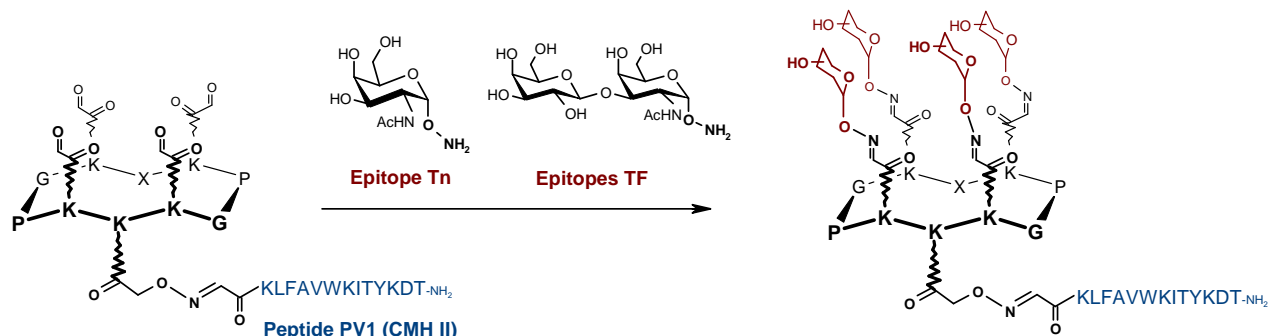
---

<sup>157</sup> G. Ragupathi, F. Koide, P. O. Livingston, Y. S. Cho, A. Endo, Q. Wan, M. K. Spassova, S. J. Keding, J. Allen, O. Ouerfelli, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky. « Preparation and Evaluation of Unimolecular Pentavalent and Hexavalent Antigenic Constructs Targeting Prostate and Breast Cancer: A Synthetic Route to Anticancer Vaccine Candidates. » *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2715-2725.



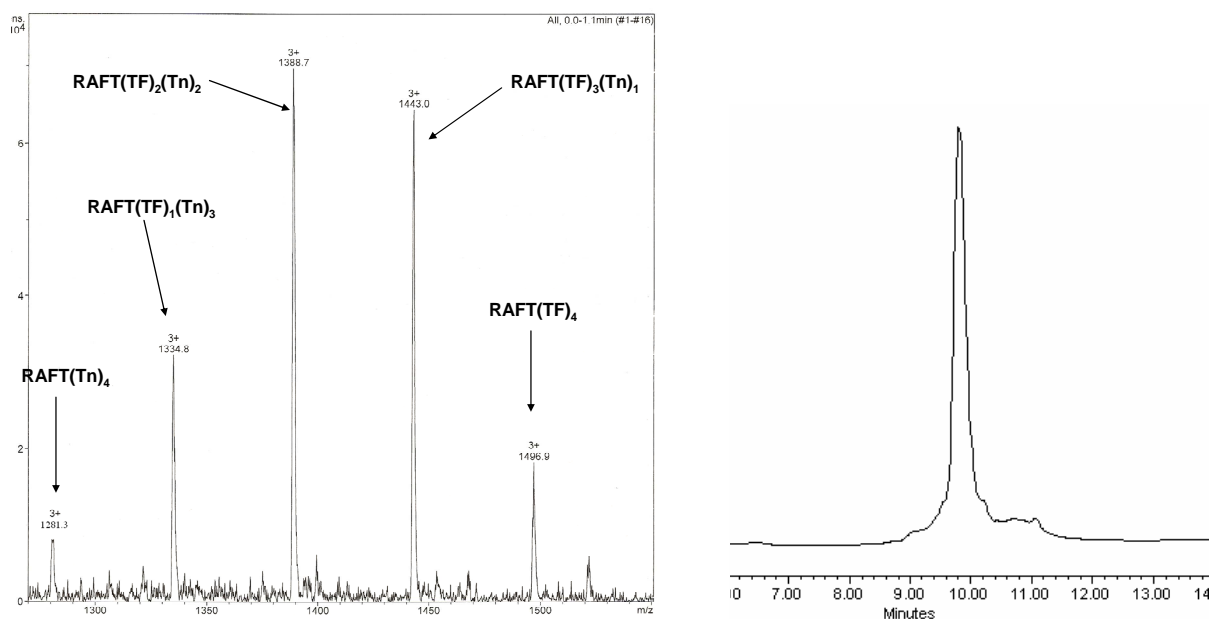
**Figure 85 :** Conjugué antigène/protéine pentavalent présentant 5 marqueurs tumoraux différents.

Dans ce contexte et afin d'évaluer l'efficacité de notre méthode de synthèse combinatoire, nous proposons de synthétiser des mélanges de marqueurs tumoraux sur une molécule RAFT portant un peptide immunostimulant issu du poliovirus PV1 sur la face inférieure<sup>88</sup> (Chap I paragraphe 3.3.2). Cette approche permettrait en une seule réaction de créer plusieurs conjugués possédant des marqueurs de tumeurs qui se différencient par leur disposition et par leur nombre. Nous avons donc réalisés l'assemblage des antigènes Tn et TF (synthétisés au laboratoire<sup>89</sup>) fonctionnalisé par une oxyamine sur le châssis peptidique RAFT (Fig. 86).



**Figure 86 :** Assemblage de marqueur de tumeurs sur le RAFT.

Cette synthèse est réalisée selon le même protocole que pour les autres types d'assemblage. Malheureusement, même si l'analyse en spectrométrie de masse confirme la présence de tous les produits attendus, le profil CLHP de ce mélange nous donne seulement un seul pic large qui ne permet pas d'identifier chaque composé (Fig. 87).

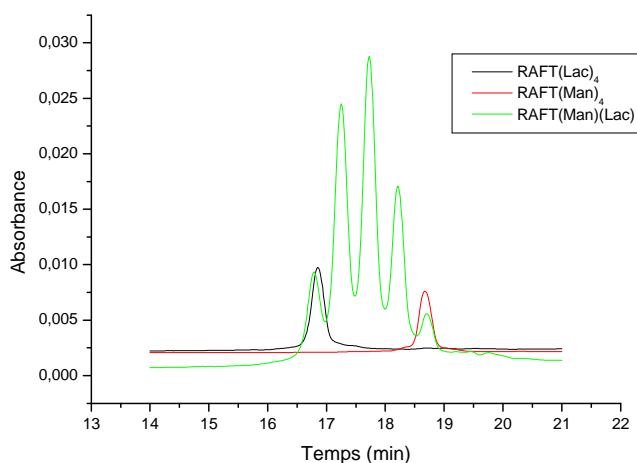


**Figure 87** : Spectre de masse (ESI) et chromatogramme CLHP du mélange Tn+TF (Gradient 5-100% B en 15 minutes).

En conclusion, on peut dire que notre méthode de synthèse est très efficace puisqu'elle permet très facilement de préparer des molécules complexes ayant un potentiel biologique prometteur.

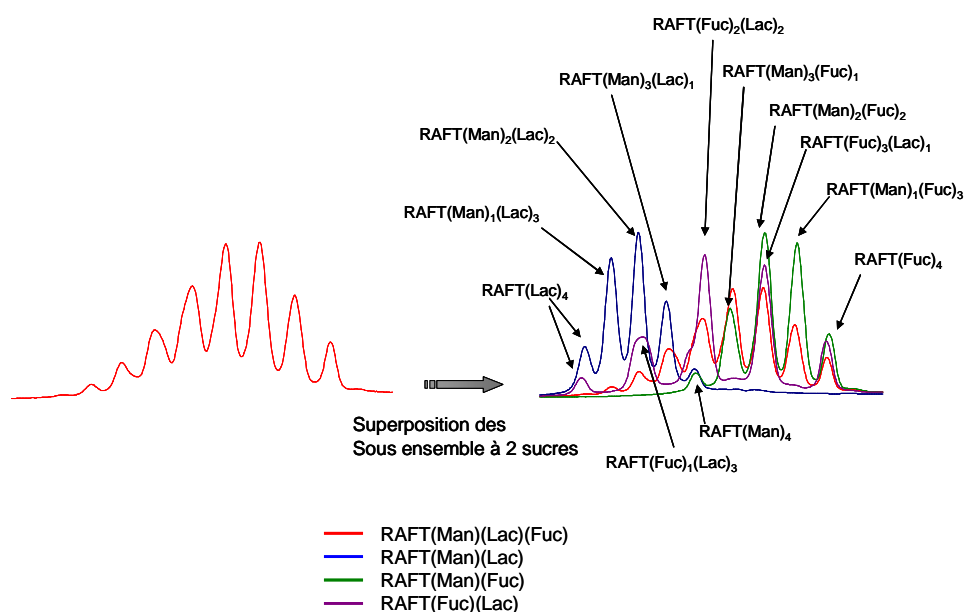
#### 4.4 Identification des différentes molécules :

Comme on l'a vu précédemment, la superposition des chromatogrammes de CLHP analytique de chaque bibliothèque constitue la base de l'identification des pics présents dans nos mélanges.



**Figure 88** : Superposition du RAFT(Man)<sub>4</sub>, RAFT(Lac)<sub>4</sub> et RAFT(Man)(Lac) (bibliothèque A) (Gradient 5-40% B en 30 minutes).

Dans l'exemple de la librairie **A** (Fig. 88), il est possible d'affirmer que le pic à gauche du mélange correspond au RAFT(Lac)<sub>4</sub> et que celui à droite correspond au RAFT(Man)<sub>4</sub>. Ainsi, on peut en déduire que les autres pics correspondent respectivement de gauche à droite aux RAFT(Lac)<sub>3</sub>(Man)<sub>1</sub>, RAFT(Lac)<sub>2</sub>(Man)<sub>2</sub> et RAFT(Lac)<sub>1</sub>(Man)<sub>3</sub>. Cependant, pour des mélanges plus complexes incluant 3 ou 4 ligands oxyamines, cette technique montre clairement ses limites. En effet, la superposition des profils CLHP est délicate et ne permet pas d'identifier chaque produit, comme dans le cas de la librairie RAFT(Man)(Lac)(Fuc) **H** (Fig. 89).



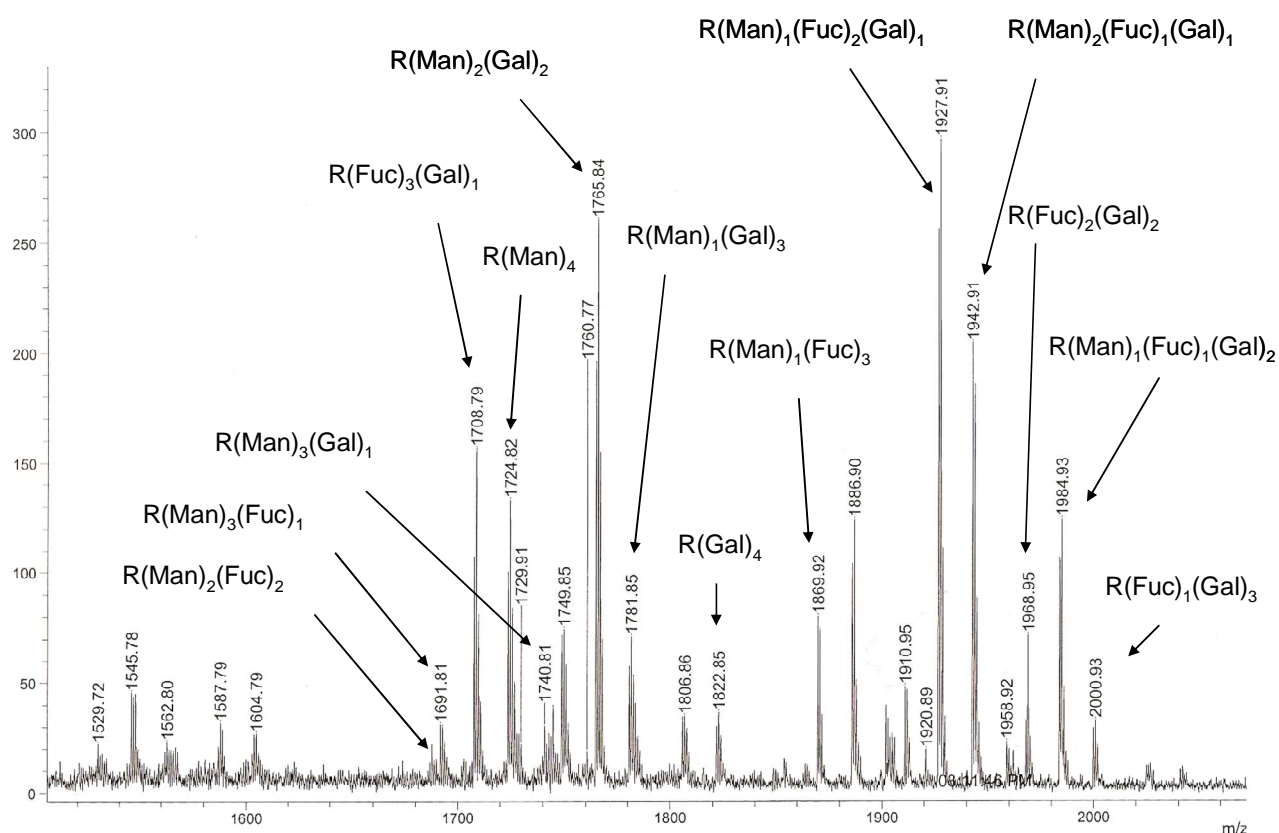
**Figure 89** : Exemple de superposition de la librairie **H** à 3 sucres avec ses 3 sous ensembles (**A**, **C** et **E**) (Gradient 5-40% B en 30 minutes).

Comme on peut le voir, il est encore possible de distinguer la plupart des produits des sous ensembles mais malheureusement, on ne parvient pas à identifier les produits du type  $2x+y+z$  qui correspondent aux nouveaux produit du mélange. De la même manière, l'identification des 15 produits théoriquement présents dans mélange RAFT(Man)(Fuc)(GalNAc) **I** est rendue impossible par leur superposition sous la forme de 5 pics (Fig. 90).



**Figure 90** : Profils d'un mélange à 3 sucres RAFT(Man)(Fuc)(GalNAc) I (Gradient 5-40% B en 30 minutes)..

Néanmoins, les produits non identifiés en CLHP sont bien présents dans le mélange car ils ont pu être identifiés sans ambiguïté en spectrométrie de masse (Fig. 91).



**Figure 91** : Spectre de masse de la sous-bibliothèque Mannose+Fucose+GalNAc I (MALDI). Les masses correspondent parfois au composé ayant perdu un motif saccharidique par élimination.

On peut noter que certains produits se sont fragmentés pendant l'analyse de masse, ce qui donne des pics intermédiaires. Ce phénomène est bien identifié au laboratoire et correspond à la cassure de la liaison N-O de l'oxime.

Ce problème de superposition constitue une limitation à notre méthode. Des alternatives reposant sur l'optimisation des conditions d'éluion et l'utilisation de colonnes CLHP

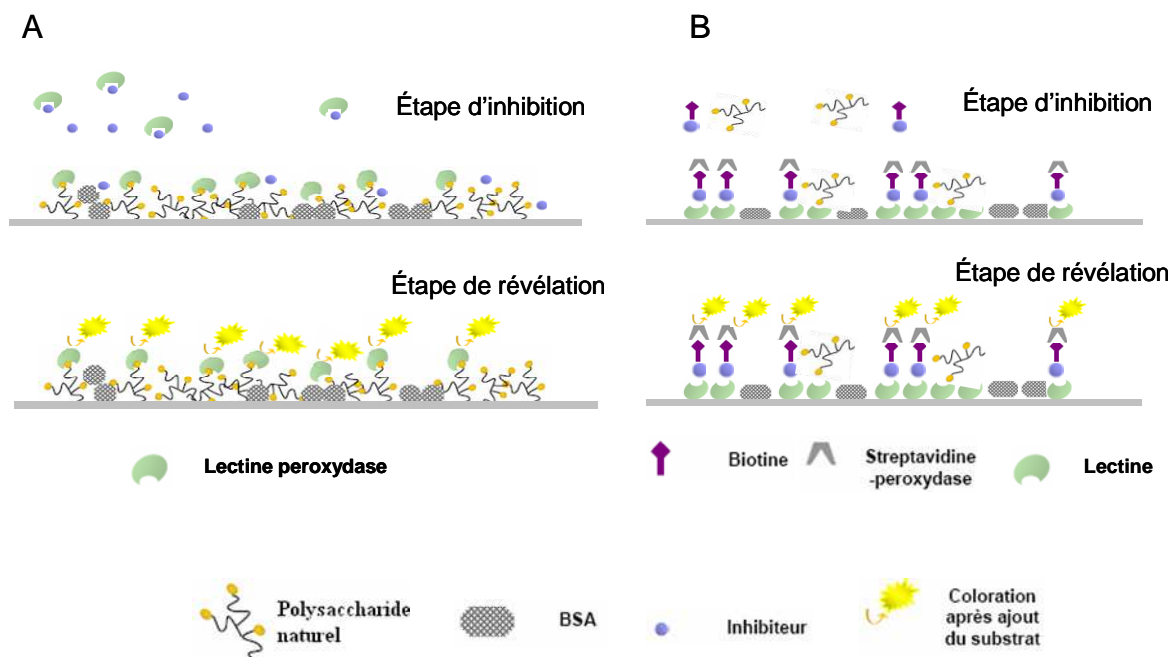
adaptées aux produits polaires (Ex : Sunfire de la société Waters) devrait permettre de résoudre ce problème. Par faute de temps, ceci n'a pas encore pu être réalisé.

## 5. Criblage biologique :

Le criblage biologique est une étape essentielle pour valider l'efficacité d'une méthode combinatoire. Dans le cas des interactions sucre/lectine, plusieurs techniques peuvent être utilisées.

### 5.1 Les tests ELLA :

Les tests ELLA (« Enzyme-Like Lectin Assays ») constituent la méthode la plus couramment employées pour évaluer la capacité d'un ligand à inhiber l'adhésion d'une lectine sur un ligand de référence<sup>158</sup>. Le principe de cette technique est identique aux tests de type ELISA habituellement utilisés en immunologie pour le dosage d'anticorps ou d'antigènes.



**Figure 92 :** A. Principe du test ELLA: Plus l'inhibiteur (en bleu) est efficace, moins la lectine se fixe sur la surface recouverte du polymère du sucre (en orange). Des lavages éliminent les lectines non fixées sur la surface. La BSA empêche les interactions non spécifiques avec la plaque plastique. B. Plus l'inhibiteur (bleu) est efficace, plus il se fixera sur la lectine immobilisé sur la plaque. Des lavages éliminent les inhibiteurs non fixés. La BSA empêche les interactions non spécifiques avec la plaque plastique (Thèse C. Sabin).

<sup>158</sup> a) D. Page, D. Zanini, R. Roy. « Macromolecular Recognition : Effect of Multivalency in the Inhibition of Binding of Yeast Mannan to Concanavalin A and Pea lectins by Mannosylated dendrimers. » *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1949-1961; b) D. Zanini, R. Roy. « Synthesis of New  $\alpha$ -thiosialodendrimers and their Binding Properties to the Sialic Acid Specific Lectin from *Limax flavus*. » *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2088-2095; c) K. Marotte, C. Preville, C. Sabin, M. Moume-PymBock, A. Imbert, R. Roy. « Synthesis and Binding Property of Divalent and Trivalent Cluster of the Lewis a Disaccharide Moiety to *Pseudomonas* lectin PAIIL. » *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2953-2961.



Cette technique consiste à immobiliser de manière non covalente à la surface d'une plaque de microtitration d'un polysaccharide naturel spécifique de la lectine (Fig. 92A). Une solution contenant la lectine couplée à un agent de détection comme une enzyme peroxydase (à une concentration constante), et l'inhibiteur (à des concentrations variables) est ensuite ajoutée. Après une période d'incubation, le complexe inhibiteur/lectine en solution est éliminé par plusieurs lavages, et la quantité de lectine restant fixée sur le polysaccharide immobilisé est dosé par colorimétrie, après ajout du substrat spécifique de l'enzyme. D'une manière générale, l'intensité de la coloration résiduelle est inversement proportionnelle à l'affinité de l'inhibiteur pour la lectine. Ainsi, d'après les mesures de densité optique, des courbes d'inhibition peuvent être tracées et permettent de déterminer des valeurs d'IC<sub>50</sub>. A l'inverse, lorsque le ligand à étudier est associé à un agent de détection (notamment biotine), une autre expérience de compétition peut être envisagée (Fig. 92B). Il s'agit d'immobiliser directement la lectine sur la plaque de microtitration et de doser la quantité de ligand biotinylé fixé. Ainsi, après incubation d'une solution contenant le ligand biotinylé (à concentration constante) et l'inhibiteur (à différentes concentrations) suivie de plusieurs lavages, la streptavidine marquée par la peroxydase est ajoutée. Grâce à la forte affinité de ce complexe avec la biotine, le dosage colorimétrique du ligand biotinylé en interaction avec la lectine peut être effectué comme précédemment.

Pour sélectionner les molécules d'intérêt dans nos mélanges de molécules, il est cependant difficile de réaliser ce type de tests puisque nos molécules ne sont pas présentes à la même concentration dans la bibliothèque. Il sera donc difficile de déduire une valeur crédible de ce genre de tests. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser des colonnes d'affinité sur lesquelles sera greffée la ConA. En effet ce type de chromatographie permet de s'affranchir de la concentration relative des différents composés du mélange et semble constituer une technique de choix pour la sélection des molécules de nos bibliothèques.

## 5.2 La chromatographie frontale d'affinité :

La chromatographie frontale d'affinité (FAC pour « Frontal Affinity Chromatography ») est une méthode quantitative développée par Kasai et coll.<sup>159</sup> qui permet de déterminer des constantes d'affinités enzyme/substrat ou des interactions faibles de type lectine/oligosaccharide. Ce système est très simple et offre l'opportunité d'identifier des

---

<sup>159</sup> J. Hirabayashi, Y. Arata, Y. Kasai. « Reinforcement of frontal affinity chromatography for effective analysis of lectin-oligosaccharide interactions. » *J. Chromatogr. A*, **2000**, 890, 261-271.

molécules actives appartenant à des bibliothèques complexes<sup>160</sup>. La théorie de cette technique est très proche de celle utilisée pour les cinétiques enzymatiques avec l'équation de Michaelis-Menten.

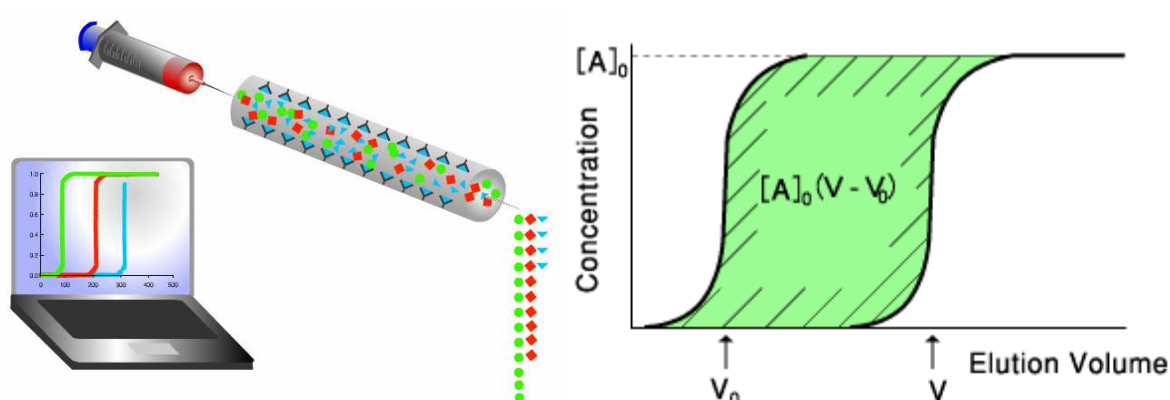


Figure 93: Principe de la FAC. Détermination du volume d'éluion.

Le principe de la FAC est le suivant: une concentration initial  $A_0$  d'un ligand A (sucre) est injecté de façon continue sur une colonne ou est greffée la cible B (lectine). Si A n'a pas d'affinité pour B alors le front d'éluion de A est caractérisé par le volume  $V_0$  (profil vert sur la figure 93). Si A a une affinité significative pour B alors le front d'éluion est retardé au point V profil rouge et bleu sur la figure 93). Il est également possible de coupler cette technique avec un appareil de spectrométrie de masse afin de déterminer directement quelles sont les molécules actives

### 5.3 Les colonnes d'affinités :

#### 5.3.1 Principe :

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté présent dans l'échantillon à analyser. Pour réaliser une chromatographie d'affinité trois étapes sont nécessaires (Fig. 94).

<sup>160</sup> D. C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li, O. Hindsgaul. « Micro-scale frontal affinity chromatography with mass spectrometric detection: a new method for the screening of compound libraries. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 3383-3387.

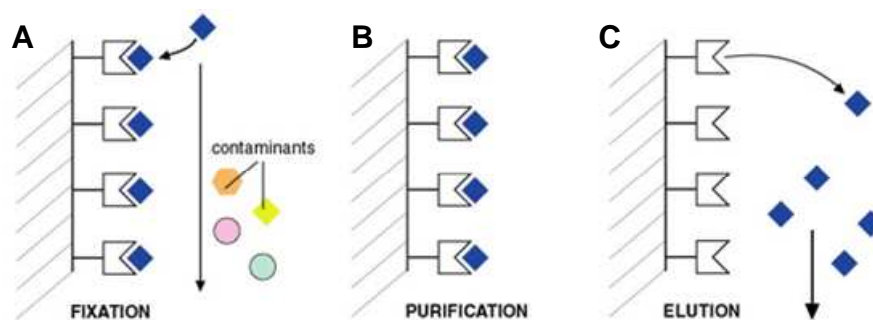


Figure 94 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

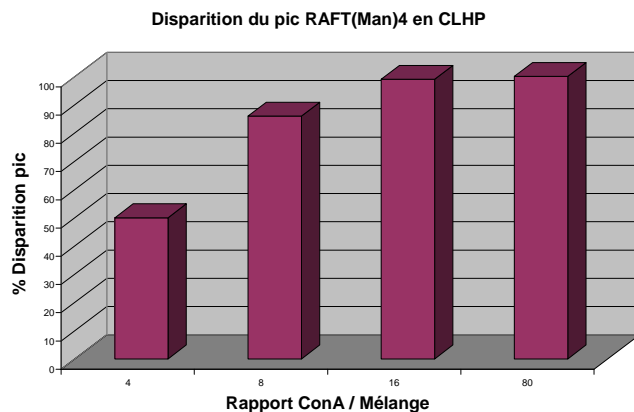
- A- Etape de fixation : le mélange de molécules est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour l'effecteur greffé sera retenu sur la colonne.
- B- Etape de purification : en continuant à faire passer du tampon sur la colonne toutes les molécules non retenues seront éliminées et éluées.
- C- Etape d'éluat : la molécule d'intérêt est décrochée de la colonne et est récupéré dans l'éluat.

L'éluat peut être réalisé de différentes façons : i) tampon de pH différent de celui ayant permis la charge qui induit un changement de l'état d'ionisation de la protéine et provoque la desorption ; ii) tampon de force ionique différente de celui ayant permis la charge qui induit un changement conformation de la protéine ; iii) compétition avec un ligand libre.

### 5.3.2 Criblage de nos bibliothèques :

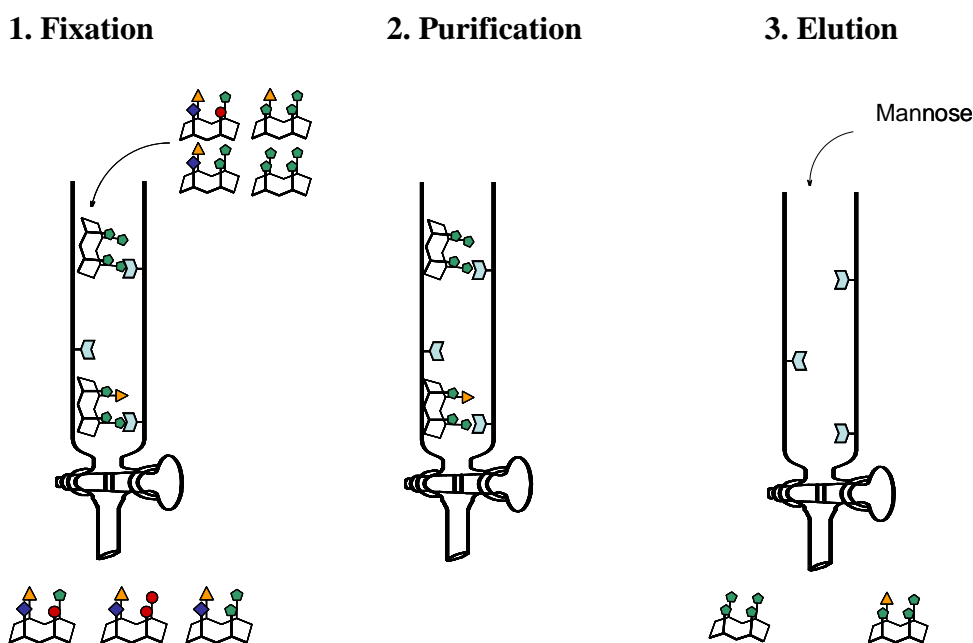
Le criblage de nos bibliothèques a été réalisé selon ce type d'expérience. Pour cela, nous utilisons une colonne d'agarose sur laquelle est greffée la Concanavaleine A (20mg/mL de colonne). L'identification des ligands qui sont restés accrochés sur la colonne est réalisée en comparant les chromatogrammes CLHP des solutions avant et après passage sur la colonne. Compte tenu des difficultés que nous avons mentionnées précédemment pour analyser certains mélanges complexes, nous nous sommes intéressés aux mélanges à 2 ligands pour la mise au point de notre méthode de criblage avec la protéine cible.

En premier lieu, nous avons dû déterminer l'excès de lectine à utiliser pour que toutes les molécules affines puissent s'y accrocher. Pour cela, nous avons utilisé le RAFT(Man)<sub>4</sub> à différentes concentration et nous l'avons déposé sur la colonne.



**Figure 95 :** Estimation de l'excès en ConA nécessaire pour avoir une totale reconnaissance des molécules affines.

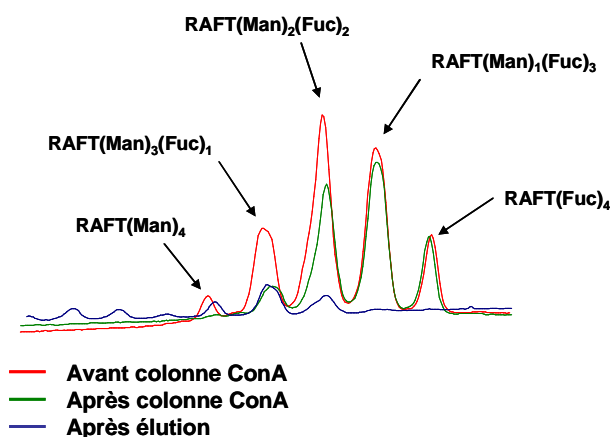
On remarque qu'il faut un large excès en ConA (16 équivalents) pour la fixation de la totalité de nos molécules (Fig. 95). Une fois cette information essentielle établie, nous pouvons tester nos molécules selon le principe décrit sur la figure suivante.



**Figure 96 :** Principe de notre test sur colonne d'affinité.

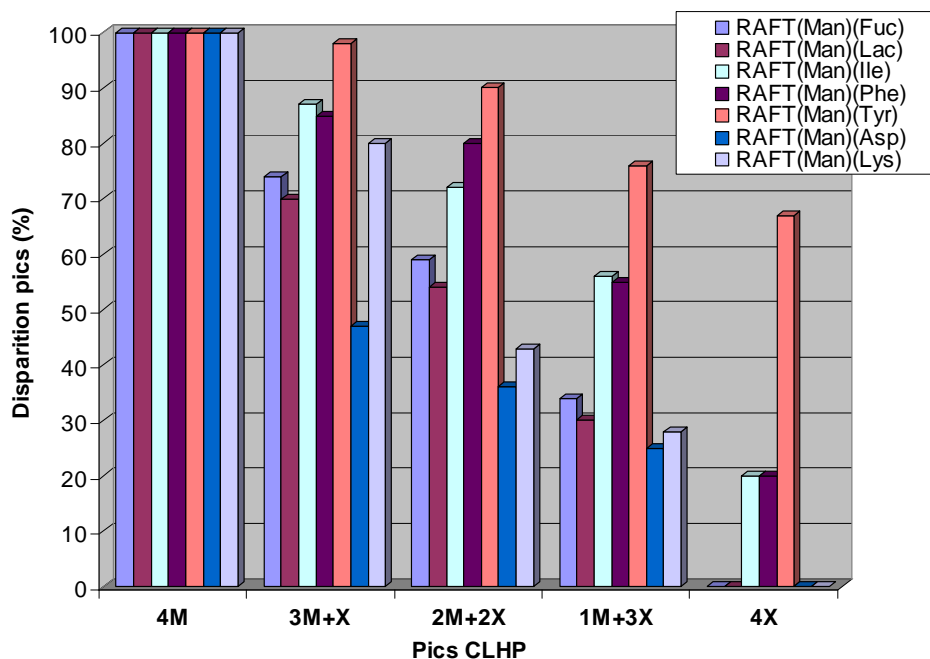
Dans un premier temps, chaque bibliothèque en solution dans du tampon Tris 20 mM pH 7.4 150 mM NaCl en présence de cations  $Mn^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  est déposée et éluée sur les colonnes préalablement conditionnées dans le même tampon. En sortie de colonne, les éluats sont récupérés et analysés par CLHP. Après plusieurs étapes de rinçage avec le tampon Tris, les ligands en interaction avec la ConA sont décrochés par ajout d'une solution d' $\alpha$ -méthylmannopyrannoside à 0.5 M. La solution ainsi récupérée est également analysée par CLHP.

En prenant l'exemple du mélange RAFT(Man)(Fuc) C, on voit que le pic correspondant au composé RAFT(Man)<sub>4</sub> a complètement disparu alors que celui correspondant au composé RAFT(Fuc)<sub>4</sub> n'a pas diminué (Fig. 97). Pour les autres composés de ce mélange, plus ils contiennent du mannose (1, 2 ou 3) et plus le pic correspondant diminue. Ce résultat est logique puisque la ConA est spécifique du mannose et non du fucose.



**Figure 97** : Superposition des profils CLHP afin d'évaluer les molécules accrochés sur la colonne d'affinité (Gradient 5-60% B en 30 minutes).

L'ensemble des mélanges à 2 ligands dont nous avons décrit la synthèse dans ce chapitre a été testé selon cette méthode. Les résultats obtenus sont représentés sous la forme d'histogrammes dans la figure 98. La hauteur des différents histogrammes est calculée en comparant l'intégration du pic CLHP avant et après passage sur la colonne. Ce graphique montre très clairement que la molécule RAFT(Man)<sub>4</sub> présent dans tous les mélanges est parfaitement retenue par la ConA. Ensuite, dès que le nombre de mannose diminue, on commence à discerner les améliorations potentielles apportées par des ligands associés au mannose. En effet, on ne voit quasiment aucune différence entre le RAFT(Man)(Lac) A et RAFT(Man)(Fuc) C ce qui signifie que ces 2 sucres n'influent pas sur la reconnaissance des composés. Par contre, on voit clairement que les résidus hydrophobes (Phe, Tyr et Ile) augmentent la reconnaissance et la fixation des molécules sur la colonne et plus particulièrement la tyrosine, au contraire des résidus chargés positivement ou négativement qui ne favorise pas la fixation.



**Figure 98** : Résultats du criblage des sous-bibliothèques à 2 ligands effectué sur colonne d'affinité.

Les molécules présentant des tyrosines et des mannoses semblent donc être les meilleures combinaisons de nos différents mélanges. Ce résultat semble cohérent avec les données de la littérature, puisque comme nous l'avons vu précédemment, des peptides contenant des tyrosines ont une affinité significative pour la ConA<sup>156</sup> ( $K_D$  équivalent au  $\alpha$ -méthylmannopyranoside). Pour compléter et confirmer ce résultat, nous avons donc isolé chaque composé du mélange sélectionné RAFT(Man)(Tyr) **L** par CLHP semi-préparative afin d'évaluer leur pouvoir d'association avec la ConA par Biacore. Comme contrôle négatif, nous avons choisi le mélange RAFT(Man)(Lac) **A**.

## 6. Etude des combinaisons sélectionnées :

### 6.1 Séparation :

Un intérêt supplémentaire de cette nouvelle méthode de chimie combinatoire résiderait dans le fait qu'on puisse resynthétiser les composés actifs de nos mélanges en suivant la même procédure. Pour cela, nous avons vu que dans la plupart des cas, les pics correspondant à chaque composé du mélange sont assez bien résolus en CLHP. Cependant, pour faciliter leur séparation en CLHP semi-préparative, nous proposons deux méthodes :

- Resynthèse en faisant varier la stoechiométrie

Nous avons étudié l'influence de la stoechiométrie des sucres mis en présence du RAFT sur la distribution de chaque pic. Dans l'exemple suivant, nous faisons varier la proportion de mannose et de fucose dans le mélange mannose+fucose et nous observons la formation préférentielle de certains produits selon le rapport utilisé de ces 2 composés. Nous sommes toujours en présence d'un total de 12 équivalents en sucres par rapport au RAFT et nous faisons varier le rapport des 2 sucres de la façon suivante : 11Man + 1Fuc, 10Man + 2Fuc, ..., 3Man + 9Fuc, 2Man + 10Fuc, 1Man + 11Fuc.

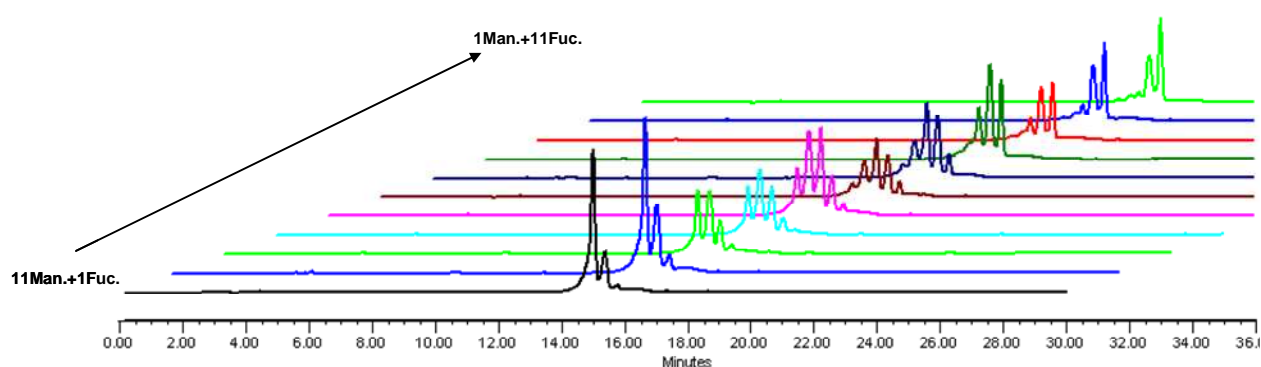


Figure 99 : Profils CLHP des différents rapports mannose/fucose (Gradient 5-60% B en 30 minutes).

Comme on le voit sur les chromatogrammes CLHP de la figure 99, il est possible d'enrichir le milieu avec un produit désiré. Ceci simplifie significativement le profil CLHP du mélange, ce qui facilite la séparation des composés de type  $3x+y$  en CLHP semi-préparative. Par exemple, lorsque le mélange est réalisé à partir du ratio 10Fuc + 2Man, il est plus facile d'isoler le produit correspondant au RAFT(Man)<sub>1</sub>(Fuc)<sub>3</sub> que dans le cas du mélange stoechiométrique.

- Purification après criblage

Une autre alternative ne nécessitant pas de re-synthétiser la bibliothèque, consiste à purifier les pics correspondants aux produits actifs, après décrochage de la colonne. Le mélange initial est ainsi débarrassé des produits non affins, ce qui simplifie les chromatogrammes et facilite grandement leur séparation en CLHP.

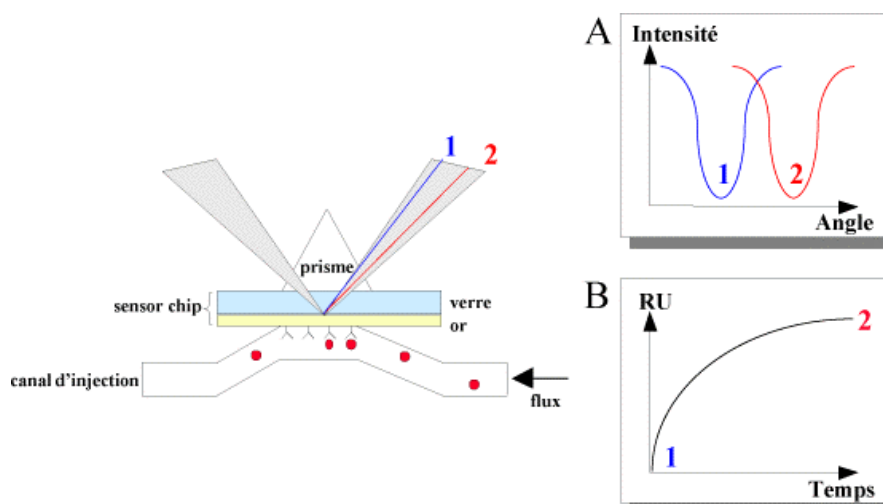
## 6.2 Etude par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) :

La résonance plasmonique de surface est une méthode optique exploitant les ondes électromagnétiques de surface pour sonder les variations de masse, d'indice et d'épaisseur survenant à l'interface entre un métal et un diélectrique. De ce fait, les interactions spécifiques

entre les molécules sondes et les molécules cibles peuvent être détectées directement dans des mélanges complexes, sans aucune transformation préalable. En outre, l'analyse des cinétiques d'interactions biomoléculaires apporte des informations essentielles sur la dynamique de ces interactions. Les champs d'application actuels couverts par cette technique concernent : les associations ligand / récepteur, ADN / protéine, ADN / ADN incluant la détection des mutations, ainsi que la caractérisation des anticorps monoclonaux et polyclonaux.

### 6.3 Le procédé BIACORE :

De part sa mise en œuvre simple et sa sensibilité, le phénomène de plasmons de surface a été appliqué, dès le début des années quatre-vingt, à la reconnaissance d'interactions biologiques. Les années quatre-vingt dix ont vu naître un grand nombre de capteurs biochimiques alliant la résonance des plasmons de surface à une chimie préparant la couche réceptrice biosensible. Cette technologie a débouché sur une instrumentation notamment commercialisée par Pharmacia sous le nom de BIAcore<sup>161</sup> (Fig. 100).



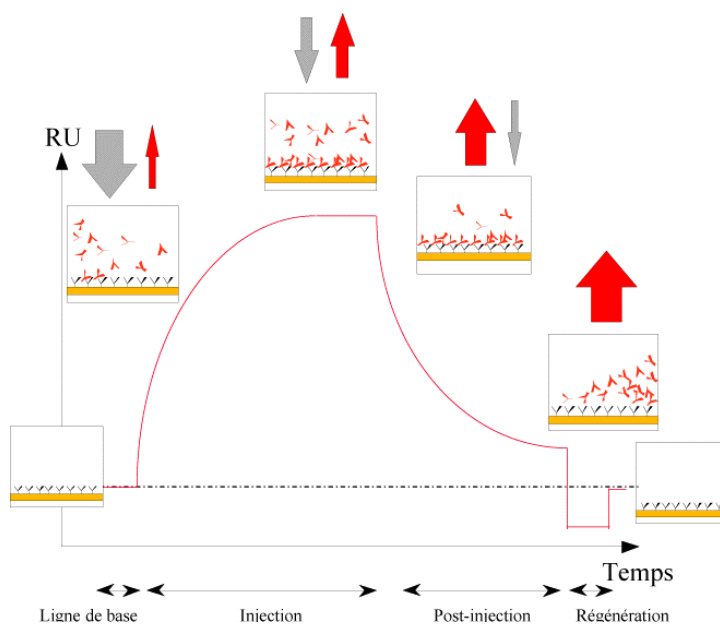
**Figure 100** : Principe de détection du BIACORE<sup>®</sup>. A : courbe de plasmons ; B : sensorgramme en fonction du temps.

Le système BIACORE<sup>®</sup> est un biocapteur utilisant le principe physique de la résonance plasmonique de surface (SPR). Il permet de mesurer en temps réel les caractéristiques d'interaction entre deux molécules sur une surface biospécifique. Pour cela, une des molécules (le ligand) est immobilisée sur la surface "sensor" et l'autre (l'analyte) est injectée. Le principe de détection par SPR quantifie des changements de l'indice de réfraction près de la surface. Ces variations de l'indice de réfraction sont ensuite reliées à celle de la masse présente à la

<sup>161</sup> M. Malmqvist. « Biospecific Interaction Analysis Using Biosensor Technology. » *Nature* **1993**, *131*, 186-187.



surface du biocapteur lors de la formation et de la dissociation des complexes moléculaires<sup>162</sup>. En effet, lorsqu'une lumière monochromatique et polarisée arrive à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, et que cette interface est recouverte d'une fine couche métallique, l'intensité de la lumière réfléchiée est nettement réduite pour un angle d'incidence particulier (Fig. 100). Ceci provient du fait qu'une composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface, jusqu'à 1  $\mu\text{m}$ . L'angle de résonance varie notamment en fonction de l'indice de réfraction, donc en fonction de la masse des molécules situées au voisinage de la surface. Par conséquent, un suivi de l'angle SPR en fonction du temps permet de suivre en temps réel l'association et la dissociation entre le ligand et l'analyte. Le signal obtenu est enregistré: c'est un sensorgramme (Fig. 101). Il est quantifié en unités de résonance (RU). Dans le cas d'une adhésion de protéine sur une sensor chip CM5, une variation de 1000 RU correspond à un déplacement de l'angle de  $0.1^\circ$  et équivaut à une fixation de 1 ng de protéine par  $\text{mm}^2$ .



**Figure 101** : Sensorgramme correspondant à la mesure de l'interaction entre deux molécules.

La molécule A immobilisée est représentée en noir, et la molécule B (analyte) est représentée en rouge. Le sensorgramme est généralement composé de 4 phases. La phase de ligne de base correspond à une injection de tampon d'étude sur la surface fonctionnalisée en molécule A. La phase d'injection est constituée par l'injection de l'analyte B sur la surface. La phase de dissociation correspond à une injection de tampon sur la surface. La phase de régénération

<sup>162</sup> L. G. Fagerstam, A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, I. Ronnberg. « Biospecific Interaction Analysis Using Surface Plasmon Resonance Detection Applied to Kinetic, Binding Site and Concentration Analysis. » *J. Chromatography A*, **1992**, 597, 397-410.

permet de dissocier totalement les complexes, et de revenir à la ligne de base initiale, grâce à l'injection d'une solution régénérante. Les flèches grise et rouge représentent les phénomènes d'association et de dissociation, la taille de chaque flèche étant proportionnelle à l'intensité du phénomène (Fig. 101).

La surface classiquement utilisée pour les expériences (Sensor Chip CM5) est constituée d'un support de verre recouvert d'un film d'or de 50 nm, sur lequel est fixé une matrice de dextran de 100 nm d'épaisseur. Cette matrice est un gel non réticulé hydrophile, permettant l'immobilisation covalente de ligands par l'intermédiaire de groupements carboxyles. Diverses chimies de couplage sur la surface sont utilisables (Fig. 102). L'immobilisation peut être réalisée de façon covalente ou non, par immobilisation directe ou par capture.

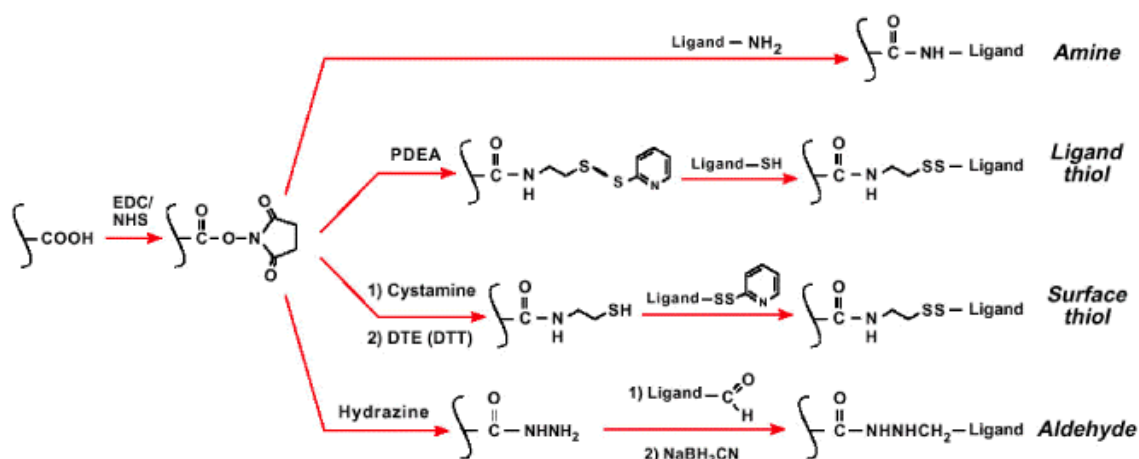


Figure 102 : Diverses chimies de couplage covalent réalisables sur les sensor chips.

Dans notre cas, nous utilisons un appareil Biacore T100 (accès sur le Plateau Caractérisation de la Plate-Forme NANOBIO, Responsable : Pr. Pierre Labbé, Grenoble) et nous immobilisons la ConA sur la surface via les fonctions amines de la protéine. La première étape consiste à activer les groupements carboxyliques du dextran grâce à un mélange EDC/NHS, permettant la formation d'esters de N-hydroxysuccinimide très réactifs (1<sup>er</sup> cas de la figure 102). Ces groupements réagissent avec les amines libres de la protéine de façon à pouvoir permettre une fixation covalente du ligand sur la sensor chip.

#### 6.4 Etude de l'affinité de nos molécules :

Cette étude a été réalisée avec l'aide de Marie Wilczewski. L'interaction sucre/lectine va se matérialiser par un signal quantifié en RU (Unité de résonance). En analysant ce signal, on pourra déterminer le  $R_{max}$  qui correspond à la quantité maximum d'analyte qui peut se fixer

sur le ligand et le  $R_{eq}$  qui est la quantité d'analyte fixée sur le ligand à l'équilibre. Lors de nos études, nous travaillons sur une surface relativement diluée en ligand afin de pouvoir s'inspirer sur un modèle d'interaction de type 1 :1. Dans le cas contraire, l'interprétation des résultats deviendrait difficile. Nous travaillons donc sur un modèle d'interaction décrit selon l'isotherme de Langmuir. On peut généralement appliquer ce modèle lorsque l'adsorption se produit en une seule couche, dans des sites d'adsorption énergiquement équivalents qui ne peuvent contenir qu'une seule molécule par site, et qu'il n'y pas d'interaction entre les molécules adsorbées. Ce modèle est représenté par une isotherme qui représente  $R_{eq}$  en fonction de C et dont l'équation est la suivante :

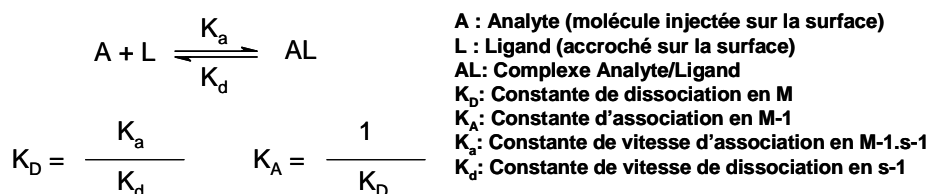
$$R_{eq} = R_{max} \frac{K_A \times C}{1 + K_A \times C} \text{ (Equation 1)}$$

où  $K_A$  représente la constante d'association et C la concentration en analyte injectée.

La représentation linéaire de l'isotherme de Langmuir permet d'obtenir la valeur de la constante de dissociation  $K_D$  qui nous permettra ainsi d'obtenir  $K_D$ :

$$\frac{R_{eq}}{C} = \frac{K_A \times R_{max}}{1 + K_A \times C} \text{ (Equation 2)}$$

Le  $K_A$  est facilement obtenu en calculant la pente de la droite obtenue, en effet ici  $K_A = - \text{pente}$ . Un moyen simple et graphique de vérifier le mécanisme d'interaction est de tracer les graphes de Scatchard selon l'équation 2. En effet si nous obtenons des droites, alors nous pourrons dire que l'interaction étudiée est bien de type 1 :1.



**Figure 103 :** Constantes utilisées lors du modèle d'interaction simple de Langmuir.

#### 6.4.1 Etude des molécules RAFT(Man)<sub>x</sub>(Lac)<sub>4-x</sub> :

L'étude s'effectue sur deux pistes d'une puce de type CM5. La première est une piste de référence sur laquelle la PNA (lectine spécifique du lactose) est immobilisée par couplage amine. Par contre, celle-ci est dénaturée par traitement à l'hydrochlorure de guanidinium 6M. Cette dénaturation est réalisée de manière à éliminer les interactions entre le lactose présent sur nos molécules et la PNA. En effet, cela fausserait tous les résultats. L'étude sera réalisée sur la seconde piste contenant la lectine ConA. L'analyte est ensuite injecté à une concentration de 0 à 400µM dans le tampon HEPES 100 mM, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> et

1 mM  $MnCl_2$  à pH 7.2 (+ 0,05% de Tween 20). Les cycles d'association-dissociation des analytes sont de 120 secondes chacun. Une phase de régénération de surface de 120 secondes est réalisée entre chaque concentration en utilisant une solution de mannose concentré à 50 mM. L'ensemble de l'étude a été effectué à un flux constant de 10  $\mu L/min$ .

Les courbes cinétiques obtenus par ces expériences avec les  $RAFT(Man)_4$ ,  $RAFT(Man)_3(Lac)_1$ ,  $RAFT(Man)_2(Lac)_2$ ,  $RAFT(Man)_1(Lac)_3$  et  $RAFT(Lac)_4$  sont données sur la figure 104. Les sensorgrammes représentés correspondent à la soustraction de la piste d'étude par la piste de référence. Cette soustraction permet d'éliminer les sauts de signal dus aux variations de viscosité des différentes solutions injectées en analyte.

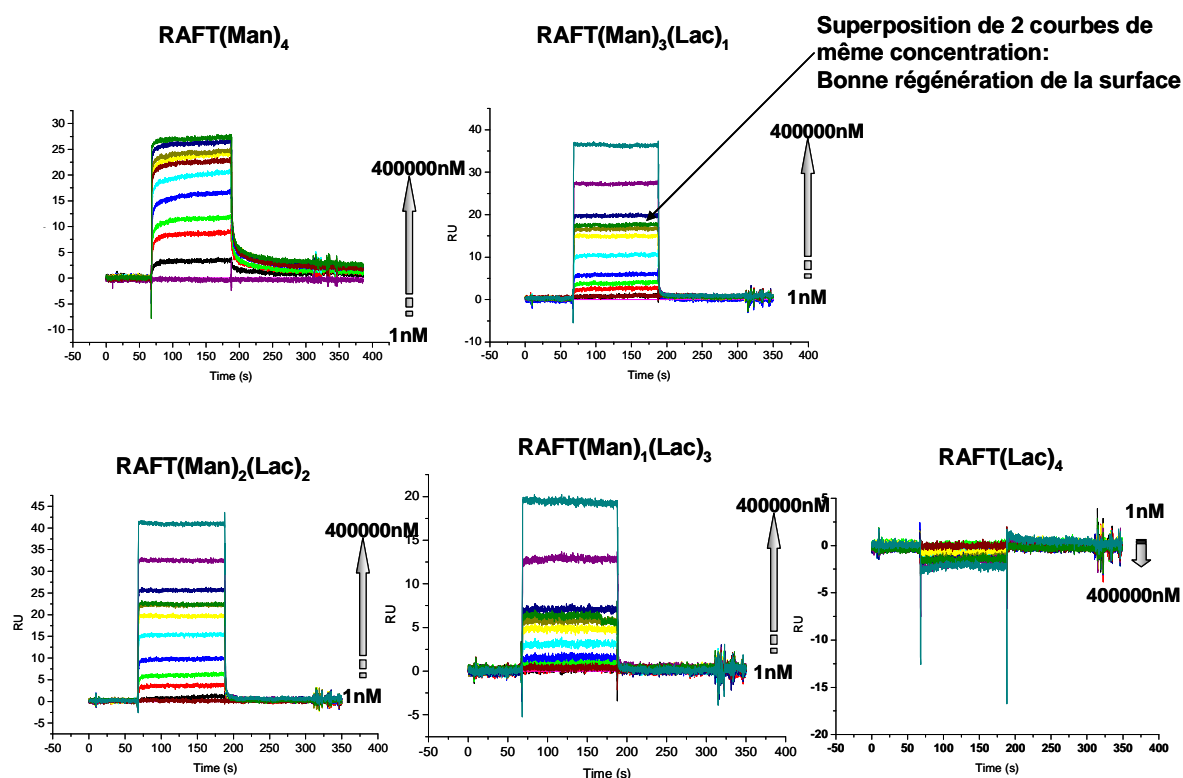
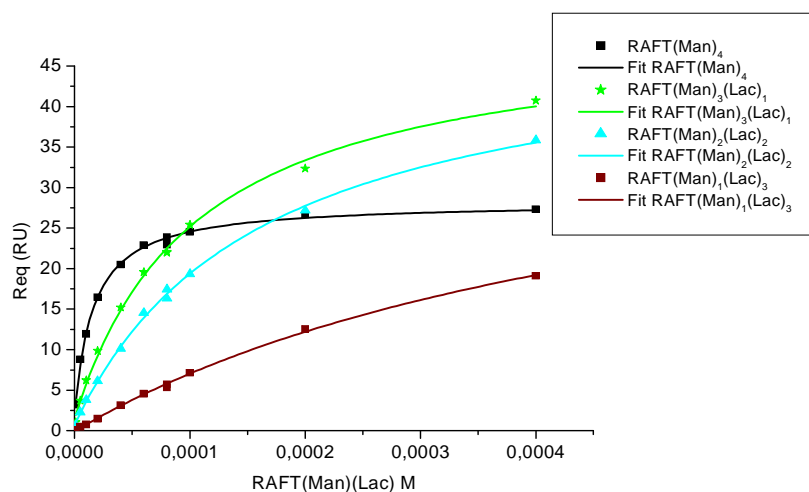


Figure 104 : Sensorgrammes des cinq types de molécules du mélange  $RAFT(Man)(Lac)$ .

D'après ces sensorgrammes, on voit tout d'abord que la régénération de surface se déroule très bien car les deux courbes correspondant à la même concentration en analyte se superposent bien dans chaque cas (Fig. 104). Les résultats expérimentaux obtenus présentent des étapes d'association et de dissociation très rapide qui empêchent toute analyse cinétique. Une étude en abaissant la température aurait pu permettre un ralentissement suffisant des processus d'interaction afin de réaliser cette étude cinétique. Dans notre cas, seul l'analyse du

signal à l'équilibre (Réq) peut être exploitée, ce qui permet de déterminer l'affinité de nos molécules sur la ConA en utilisant l'isotherme de Langmuir. La figure 105 représente ces isothermes qui représentent pour chaque molécule la quantité à l'équilibre d'analyte absorbée (Réq) en fonction de la concentration en analyte.



**Figure 105 :** Courbes représentant les isothermes de Langmuir des RAFT(Man)<sub>x</sub>(Lac)<sub>4-x</sub>.

On remarque que la valeur du Réq au plateau est différente selon les molécules, ce qui est probablement dû à la différence de masse moléculaire assez importante entre les molécules contenant du lactose et du mannose. En effet, la masse moléculaire est directement liée à la valeur de l'indice de réfraction et donc aura une incidence sur la valeur des Réq obtenus. La valeur du  $K_D$  est obtenue à partir de l'équation 2 donnée précédemment. D'après le tableau 8, on voit que plus les molécules possèdent de mannose, plus l'affinité due à la présentation des sucres en cluster est meilleure ( $K_D$  diminue). La valeur du  $\chi^2$  obtenu représente la différence entre les courbes expérimentales et les courbes modélisées. Dans notre cas, la valeur du  $\chi^2$  faibles obtenues semblent attestées de la bonne modélisation de nos résultats.

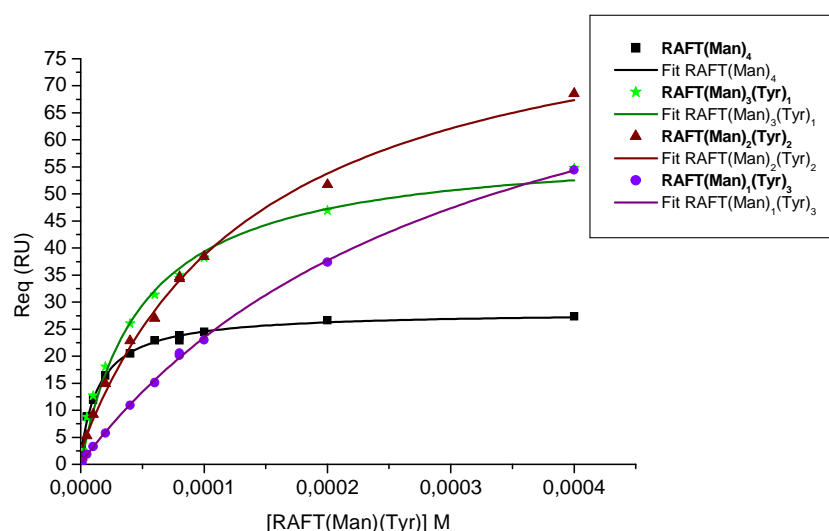
RAFT	$K_D$ ( $\mu$ M)	$\chi^2$
RAFT(Man) <sub>4</sub>	<b>44</b>	0,186
RAFT(Man) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub>	<b>106</b>	0,467
RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub>	<b>163</b>	0,208
RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub>	<b>532</b>	0,049
RAFT(Lac) <sub>4</sub>	×	×

**Tableau 8 :** Valeur des constantes de dissociation.

### 6.4.2 Etude des molécules RAFT(Man)<sub>x</sub>(Tyr)<sub>4-x</sub> :

Les dérivés avec la tyrosine sont étudiés de la même manière. Nous avons tout d'abord étudié la présence ou non d'adhésion non spécifique sur la piste de référence PNA. On injecte différentes concentrations du mélange RAFT(Man)(Tyr) **L** sur cette piste. On observe une légère adhésion non spécifique pour les fortes concentrations.

Les résultats obtenus avec les composés isolés RAFT(Man)<sub>4</sub>, RAFT(Man)<sub>3</sub>(Tyr)<sub>1</sub>, RAFT(Man)<sub>2</sub>(Tyr)<sub>2</sub>, RAFT(Man)<sub>1</sub>(Tyr)<sub>3</sub> sont donnés sur la figure 106 et le tableau 9.



**Figure 106** : Courbes représentant les isothermes de Langmuir des RAFT(Man)<sub>x</sub>(Tyr)<sub>4-x</sub>.

Selon la même observation que précédemment, on voit que les valeurs maximums du Réq obtenus sont différentes selon les molécules. Ici, il y a non seulement la masse moléculaire mais également l'interaction non spécifique des tyrosines sur la ConA qui rentrent en jeu. En effet, l'interaction supposée des molécules contenant des tyrosines sur des sites d'interactions différents de celui du mannose pourrait expliquer la différence de quantité de molécule qui adhère à la surface (Réq).

Comme précédemment, on voit tout d'abord que le  $K_D$  diminue quand le nombre de mannose augmente. Il semble que pour les molécules RAFT(Man)<sub>4</sub> et RAFT(Man)<sub>1</sub>(Tyr)<sub>3</sub> le modèle d'interaction 1:1 de Langmuir corresponde bien ( $\chi^2$  correct). Pour les RAFT(Man)<sub>3</sub>(Tyr)<sub>1</sub> et RAFT(Man)<sub>2</sub>(Tyr)<sub>2</sub>, la valeur du  $\chi^2$  est légèrement plus élevée. Ceci pourrait suggérer que le modèle de fit employé n'est pas le mieux adapté pour décrire le type d'interaction impliqué.

RAFT	$K_D$ ( $\mu$ M)	$\chi^2$
RAFT(Man) <sub>4</sub>	44	0,186
RAFT(Man) <sub>3</sub> (Tyr) <sub>1</sub>	50	3,97
RAFT(Man) <sub>2</sub> (Tyr) <sub>2</sub>	145	2,11
RAFT(Man) <sub>1</sub> (Tyr) <sub>3</sub>	320	0,190

Tableau 9 : Valeur des constantes de dissociation.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus sur les deux lots de molécules testées (combinaison Man/Lac et Man/Tyr), on s'aperçoit que pour les molécules à nombre équivalent en mannose, le  $K_D$  est inférieur pour celles contenant la tyrosine. Cette différence devient moins importante lorsque que l'on diminue le nombre de mannoses. Par contre, pour des molécules de types RAFT(Man)<sub>3</sub>, on note un facteur 2 dans le  $K_D$  qui n'est pas négligeable. On observe également que le  $K_D$  du RAFT(Man)<sub>3</sub>(Tyr)<sub>1</sub> est proche de celui du RAFT(Man)<sub>4</sub>. Ces résultats semblent signifier que la tyrosine stabilise le complexe formé avec la lectine et permet de compenser l'affinité perdue par un mannose. Il est tout à fait plausible que la tyrosine se lie sur le second site proche du site d'interaction du mannose dont nous avons parlé dans ce chapitre, augmentant ainsi l'affinité de la molécule.

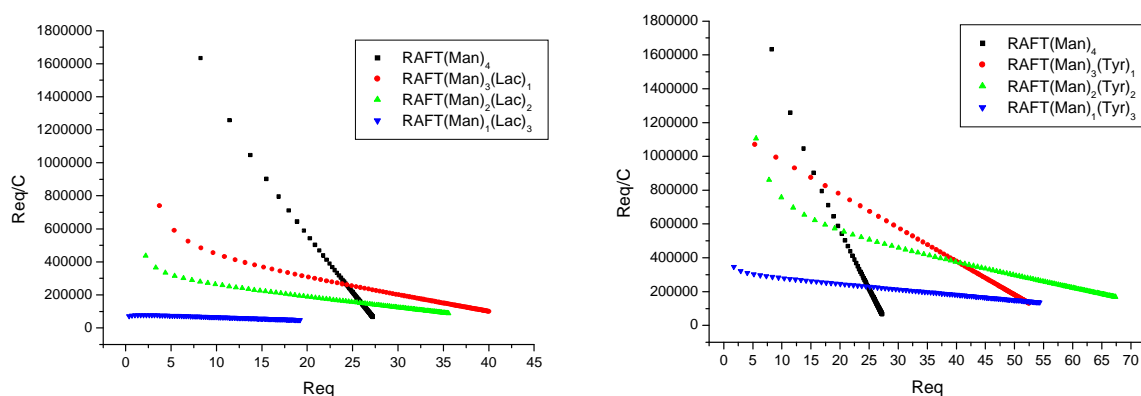


Figure 107 : Représentation linéaire des isothermes de Langmuir (Scatchard).

En ce qui concerne le mode d'interaction, il semblerait pour les molécules RAFT(Man)(Lac) qu'il s'agit d'interactions de type 1:1 et donc que le lactose ne joue pas de rôle dans l'interaction. Par contre, pour les molécules RAFT(Man)(Tyr), il est difficile de spéculer sur le type d'interaction. En effet, la représentation de Scatchard (Fig. 107) des isothermes de Langmuir obtenus sous la forme de droite nous permet confirmer que ce modèle permet d'obtenir des valeurs de  $K_D$  cohérentes de l'expérience réalisée. Cependant, la composition

de ces molécules possédant des mannoses et des tyrosines et les valeurs de  $K_D$  calculées laissent supposer que l'interaction pourrait faire intervenir un site secondaire de liaison, conformément aux travaux de Goldstein<sup>156</sup> dont nous avons parlé précédemment. Des études de modélisation et de docking pourront être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

En conclusion, ces expériences de SPR nous ont permis de confirmer les résultats obtenus lors du criblage. Il semble en effet que le tandem mannose/tyrosine sélectionné par colonne d'affinité représente la meilleure combinaison (parmi celles étudiées) pour améliorer l'interaction avec la ConA.





---

*Chapitre 3 :*  
*Bibliothèques de*  
*peptides cycliques*  
*par « split and mix »*

---



## Chapitre 3. Bibliothèques de peptides cycliques par « split and mix »

---

Les peptides cycliques sont une source de composés biologiquement qu'on peut trouver chez les plantes, les bactéries, les champignons et les animaux marins<sup>163</sup>. En comparaison aux peptides linéaires, les peptides cycliques sont plus stables contre les dégradations protéolytiques en raison de l'absence d'extrémité N- et C-terminales. Les avantages entropiques associés à l'augmentation de rigidité rendent les peptides cycliques potentiellement plus spécifiques des récepteurs macromoléculaires. De plus, ils offrent une biodisponibilité supérieure (meilleure perméabilité membranaire) aux peptides linéaires par l'absence des charges en N- et C-terminal et leur faculté de former des liaisons hydrogènes intramoléculaires<sup>164</sup>. Quelques peptides cycliques comme la cyclosporin A (immunosuppresseur)<sup>165</sup>, la caspofungin (agent antifongique)<sup>166</sup> et la daptomycin (antibiotique)<sup>167</sup> sont utilisés cliniquement comme agents thérapeutiques. La chimie combinatoire, utilisant en particulier la méthode « split and mix » est largement employée pour découvrir de nouveaux peptides cycliques actifs<sup>168</sup>.

### 1. Le concept du « split and mix » :

L'intérêt des méthodes de synthèse sur support solide est de pouvoir utiliser de gros excès de réactifs afin d'accélérer les réactions. Néanmoins, si l'on utilise les stratégies classiques de mélanges de produits, on se heurte au risque de voir les composés les plus réactifs du mélange être sur-représentés dans les molécules obtenues en fin de synthèse, ce qui pourrait masquer l'activité intéressante d'un des composants de la bibliothèque. Pour remédier à ce problème, une technique a été développée: la synthèse "partage/mélange"(split and mix) ou synthèse

---

<sup>163</sup> a) P. Wipf. « Synthetic Studies of Biologically Active Marine Cyclopeptides. » *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2115-2134; b) Y. Hamada, T. Shioiri. « Recent Progress of the Synthetic Studies of Biologically Active Marine Cyclic Peptides and Depsipeptides. » *Chem. Rev.* **2005**, 105, 4441-4482; c) A. B. Pomolio, M. E. Battista, A. A. Vitale. « Naturally Occurring Cyclopeptides: Structures and Bioactivity. » *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 2075-2121.

<sup>164</sup> T. Rezai, J. E. Bock, M. V. Zhou, C. Kalyanaraman, R. S. Lokey, M. P. Jacobson. « Conformational Flexibility, Internal Hydrogen Bonding, and Passive Membrane Permeability: Successful *in silico* Prediction of the Relative Permeabilities of Cyclic Peptides. » *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 8, 14073-14080.

<sup>165</sup> M. R. Wenger. « Cyclosporin A. » *Biomed. J.* **1982**, 3, 19-31.

<sup>166</sup> P. Sandhu, X. Xu, P. J. Bondiskey, S. K. Balani, M. L. Morris, Y. S. Tang, A. R. Miller, P. G. Pearson. « Disposition of Caspofungin, a Novel Antifungal Agent in Mice, Rats, Rabbits and Monkeys. » *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1272-1280.

<sup>167</sup> A. Raja, J. LaBonte, J. Lebbos, P. Kirkpatrick. « Daptomycin. » *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 943-944.

<sup>168</sup> a) Q. Xiao, D. Pei. « High-throughput Synthesis and Screening of Cyclic Peptide Antibiotics. » *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3132-3137; b) M. S. Donia, B. J. H. Hathaway, S. Sudek, M. G. Haygood, M. J. Rosovitz, J. Ravel, E. W. Schmidt. « Natural Combinatorial Peptide Libraries in Cyanobacterial Symbionts of Marine ascidians. » *Nature Chem. Biol.* **2006**, 2, 729-735; c) X. Zang, Z. Yu, Y. H. Chu. « Tight-binding Streptavidin Ligands from a Cyclic Peptide Library. » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2327-2332.

"une bille/une molécule" (one-bead one-compound, OBOC). Cette méthode développée par Furka *et coll.*, décrit notamment la synthèse d'une banque de 27 tripeptides et 180 pentapeptides<sup>169</sup>. Avant chaque étape combinatoire de couplage, les billes de polymères sont divisées en autant de lots que de réactifs introduits au cours de l'étape. Chaque lot est mis en réaction individuellement permettant d'employer un large excès de réactif. En fin de réaction, on re-mélange les billes de résine avant de les diviser à nouveau en lots pour l'étape suivante. En fin de synthèse, chaque bille aura suivi un chemin unique et portera à sa surface une seule espèce moléculaire comme l'illustre la Figure 108.

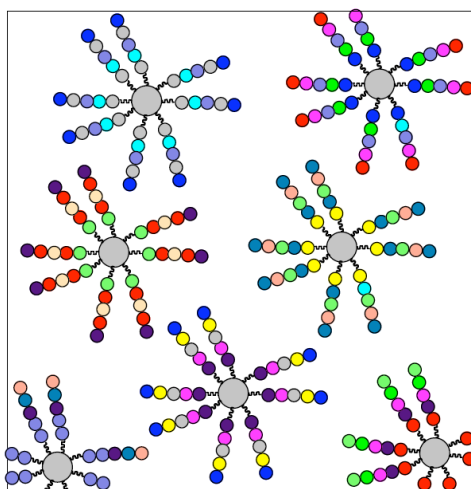


Figure 108 : Illustration de la technique de « one bead one compound ».

Lors des premières études sur ce sujet, Lam *et coll.* ont découvert un peptide capable de se fixer sur l'anticorps anti- $\beta$ -endorphine ainsi que sur celui de la streptavidine<sup>170</sup>. Par la suite, Houghten *et coll.* ont décrit une bibliothèque de 34 millions de peptides existant sous la forme de 324 mélanges qui furent criblés en utilisant des techniques de déconvolutions dans le but de découvrir des inhibiteurs d'anticorps<sup>44</sup>. Ces travaux furent à l'origine de nombreuses études portant sur le thème OBOC, dont ceux sur les peptides cycliques<sup>171</sup>, peptoides<sup>172</sup>, peptidomimétique<sup>173</sup> et petites molécules organiques<sup>54</sup>. En utilisant cette méthode, des ligands

<sup>169</sup> A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo. « General Method for Rapid Synthesis of Multicomponent Peptide Mixtures. » *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 487-93.

<sup>170</sup> K. S. Lahm, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp. « A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-binding Activity. » *Nature* **1991**, 354, 82-84.

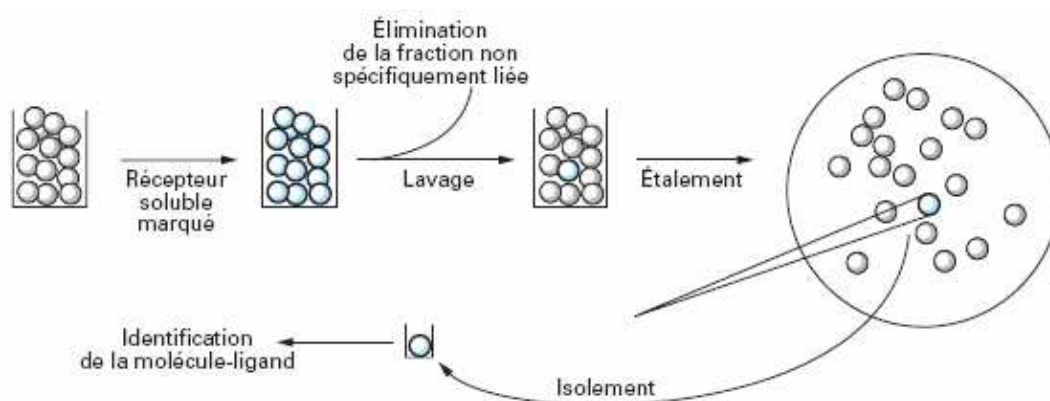
<sup>171</sup> J. D. McBride, N. Freeman, G. J. Domingo, R. J. Leatherbarrow. « Selection of Chymotrypsin Inhibitors from a Conformationally-constrained Combinatorial Peptide Library. » *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 819-827.

<sup>172</sup> P. Allury, M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, H. Olivos, T. Kodadek. « Isolation of Protein Ligands from Large Peptoid Libraries. » *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13995-14004.

<sup>173</sup> R. W. Liu, J. Mark, K. S. Lahm. « A Novel Peptide-Based Encoding System for "One-Bead One-Compound" Peptidomimetic and Small Molecule Combinatorial Libraries. » *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7678-7680.

de nombreuses cibles biologiques telles que les inhibiteurs et substrats d'enzymes (kinase<sup>174</sup>, protéases<sup>175</sup>) ou les enzymes artificielles<sup>176</sup> ont été décrits.

La plupart des études avec des bibliothèques OBOC impliquent le criblage sur billes de résine (Fig. 109).



**Figure 109** : Principe de criblage sur billes et d'identification des billes actives.

Comme nous l'avons abordé en introduction, les tests couramment utilisés sont le quenching de fluorescence pour les substrats de protéases<sup>175</sup>, les tests colorimétriques via des enzymes<sup>177</sup> ou les tests de fixation de cellules<sup>178</sup>. Cependant, la synthèse combinatoire demande une identification après criblage des peptides actifs.

## 2. Identification des séquences des peptides cycliques par Analyse en Acide Aminé (AAA) :

En chimie combinatoire, le principal problème est la détermination des structures actives d'une bibliothèque. La structure des peptides ou des peptoïdes composés d' $\alpha$ -acides aminés et possédant l'extrémité N-terminale libre peut être déterminée par le séquençage d'Edman<sup>179</sup>. Par contre, les peptides contenant des  $\beta$ -et  $\gamma$ -acides aminés, les peptides branchés

<sup>174</sup> K. Lahm, R. Liu, S. Miyamoto, A. Lehman, J. Tuscano. « Applications of One-Bead One-Compound Combinatorial Libraries and Chemical Microarrays in Signal Transduction Research. » *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 370-377.

<sup>175</sup> M. Meldal, J. Svendsen, K. Breddam, F. Auzanneau. « Portion-Mixing Peptide Libraries of Quenched Fluorogenic Substrates for Complete Subsite Mapping of Endoprotease Specificity. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3314-3318.

<sup>176</sup> G. Copeland, S. Miller. « Selection of Enantioselective Acyl Transfer Catalysts from a Pooled Peptide Library through a Fluorescence-Based Activity Assay: An Approach to Kinetic Resolution of Secondary Alcohols of Broad Structural Scope. » *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *3*, 6496-6502.

<sup>177</sup> K. S. Lahm, M. Lebl. « Streptavidin and Avidin Recognize Peptide Ligands with Different Motifs. » *Immunomethods* **1992**, *1*, 11-15.

<sup>178</sup> O. H. Aina, J. Marik, R. Liu, D. H. Lau, K.S. Lahm. « Identification of Novel Targeting Peptides for Human Ovarian Cancer Cells Using "One-Bead One-Compound" Combinatorial Libraries. » *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 806-813.

<sup>179</sup> P. Edman. « Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. » *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 283-293.

(dendrimères), les peptides acétylés en N-terminale ne sont pas séquençables par cette technique.

Il en est de même pour les peptides cyclisés via leur extrémité N-terminale, néanmoins, les méthodes de déconvolutions ou de « tag » que nous avons décrites en introduction et utilisant la spectrométrie de masse peuvent permettre de déterminer leur séquence<sup>180</sup>. Néanmoins, ces méthodes ne fournissent pas une vision quantitative de chaque bille, ce qui peut conduire à une mauvaise analyse de la bibliothèque. De plus, les étapes de synthèses supplémentaires nécessaires à l'obtention du « tag » et leurs interférences possibles lors du criblage représentent des inconvénients supplémentaires de ces techniques. Pour remédier à cela, l'équipe du Prof. J.-L. Reymond (Université de Berne, Suisse) a développée une méthode d'encodage « Tags-free » de peptides linéaires et cycliques ne nécessitant pas l'utilisation de marqueurs moléculaires<sup>62</sup>.

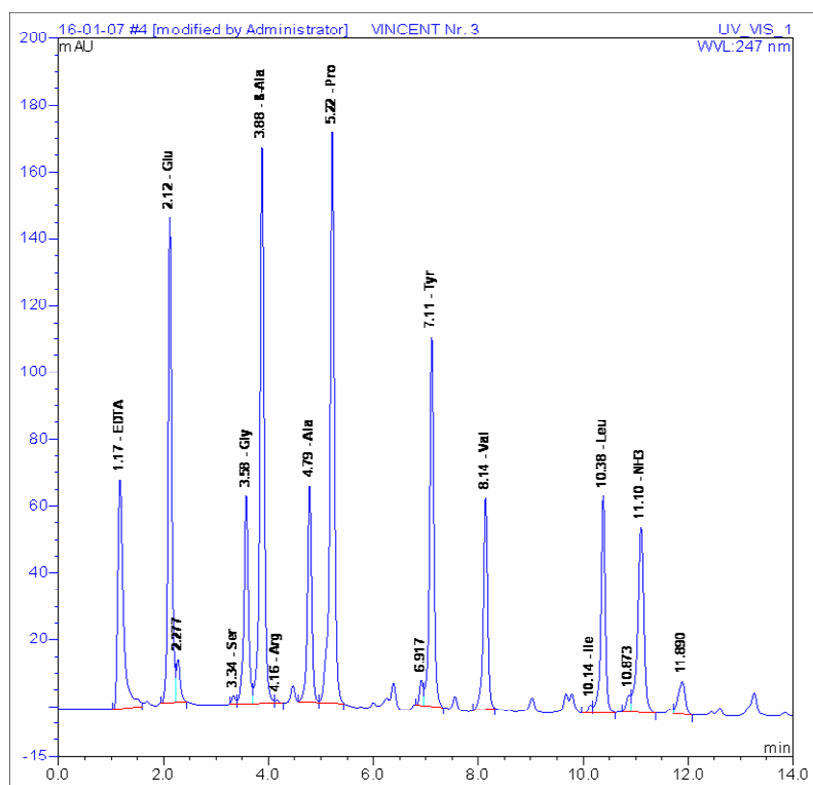
En 1997 Weinberger *et coll.* suggèrent que l'analyse de la composition en acide aminé pouvait être un moyen efficace de déterminer la structure des peptides<sup>181</sup>. L'analyse fournissant la composition relative en acide aminé d'une protéine ou d'un peptide est une expérience de routine en biochimie. Elle repose sur l'hydrolyse de la séquence à analyser dans des vapeurs d'acide chlorydrique 6N pendant 24 heures à 110°C. Ensuite, les acides aminés libres sont couplés avec l'isothiocyanate de phenyl afin d'obtenir l'acide aminé thiocarbamyl de phenyl. Ces résidus sont ensuite séparés sur une colonne en phase inverse de type C<sub>18</sub> afin de quantifier chaque acide aminé par UV (Fig. 110). Il faut noter que pendant l'hydrolyse acide, l'asparagine et la glutamine sont désaminées pour donner l'acide aspartique et glutamique rendant leur différenciation impossible. De plus, le tryptophane et la cystéine sont détruits pendant l'analyse.

La méthode de détermination de séquences peptidiques mise au point par J.-L. Reymond repose sur ce principe. Cette technique est particulièrement attractive car elle ne nécessite aucune opération d'encodage chimique, elle peut être réalisée sur de grandes quantités de billes à faible coût et permet de fournir un contrôle qualitatif sur la séquence présente sur la bille.

---

<sup>180</sup> a) S. H. Joo, Q. Xiao, Y. Ling, B. Gopishetty, D. Pei. « High-Throughput Sequence Determination of Cyclic Peptide Library Members by Partial Edman Degradation/Mass Spectrometry. » *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *8*, 13000-13009; b) J. E. Redman, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri. « Automated Mass Spectrometric Determination of Cyclic Peptide Members. » *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 33-40.

<sup>181</sup> H. Weinberger, E. Lichte, C. Griesinger, B. Kutscher. « Small Peptide Libraries: Combinatorial Split-Mix Synthesis followed by Combinatorial Amino Acid Analysis of Selected Variants. » *Arch. Pharm.* **1997**, *330*, 109-111.



**Figure 110 :** Profil d'hydrolyse d'un peptide (quantité de chaque acide aminé présent dans le peptide).

Elle nécessite un design limitant à 2 copies le nombre de chaque acide aminé utilisé dans les différents « splits ». Chacun de ces acides aminés sera disposé selon une matrice à deux dimensions sous la forme de « paires uniques » (Fig. 111).

**Table 1.** Comparison of a "Unique Pair" Library of Tripeptides versus a Full Combinatorial Library

	combinatorial library			unique pair library		
	X <sup>3</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>1</sup>
	A	A	A	A	A	
	B	B	B	B		B
	C	C	C		C	C
amino acid analysis	parent sequence(s)			parent sequences		
ABC	ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA			ACB, BAC		
A <sub>2</sub> B	AAB, ABA, BBA			AAB		
A <sub>2</sub> C	AAC, ACA, CAA			AAC		
B <sub>2</sub> A	BBA, BAB, ABB			BAB		
B <sub>2</sub> C	BBC, BCB, CBB			BCB		
C <sub>2</sub> A	CCA, CAC, ACC			ACC		
C <sub>2</sub> B	CCB, CBC, BCC			BCC		
A <sub>3</sub> , B <sub>3</sub> , C <sub>3</sub>	AAA, BBB or CCC					
total	27 sequences, 10 profiles			8 sequences, 7 profiles		
degeneracy	D = 2.7			D = 1.14		

**Figure 111 :** Comparaison entre technique d'encodage par paires uniques et chimie combinatoire traditionnelle ainsi que le nombre de séquence possible trouvé par plusieurs AAA. « D » représente la dégénérescence de la bibliothèque et est calculée en divisant le nombre de composé de la bibliothèque par le nombre de profil d'hydrolyse ; plus il est proche de 1 plus l'identification des séquences sera aisée.



Le principe de paires uniques est représenté sur la figure 111 pour le cas d'un tripeptide avec 3 acides aminés A, B et C. En chimie combinatoire classique, on peut obtenir 27 peptides différents qui seront analysés par seulement 10 profils d'hydrolyses. Ceux-ci correspondent à plusieurs séquences et sont traduits par un niveau de dégénérescence élevé ( $D = 2.7$ ), reflétant ainsi la difficulté de l'identification. Dans le cas de l'utilisation des paires uniques, 8 tripeptides seront formés et seulement 7 profils d'hydrolyses seront possibles ( $D = 1.14$ ). Dans ce cas seulement le profil ABC peut correspondre à 2 séquences (ACB ou BAC).

Dans un peptide de longueur  $N$ , le nombre de paires uniques est donné par la relation suivante<sup>182</sup> :  $U(N) = N(N-1)/2$ . Cette technique permet de former des bibliothèques avec  $M$  acide aminés sous la forme de  $M$  paires uniques (Fig. 112). Ce design permet de garder un niveau de dégénérescence bas, mais de former des bibliothèques de toutes tailles.

**Table 2.** Comparison of Different Unique Pair Libraries

no.	$N^a$	$U^b$	split <sup>c</sup>	library size (T)	AAA <sup>d</sup>	AAA with 1 sequence	AAA with 2 sequences	AAA with 4 sequences	$D^e$
1	2	1	1	1	1	1	0	0	1.00
2	3	3	2	8	7	6	1	0	1.14
3	4	6	3	81	66	51	15	0	1.23
4	5	10	4	1024	792	560	232	0	1.30
5	6	15	5	15625	11590	7575	4005	10	1.35
6	7	21	6	279936	200469	122052	77892	525	1.40
7	8	28	7	5,764801	4,004490	2,285353	1,698550	20587	1.44
8	8	16 <sup>b</sup>	4	65536	54730	43960	10752	72	1.20

<sup>a</sup>  $N$  is the length of the peptide. <sup>b</sup>  $U$  is the number of unique pairs used, which is  $U = N(N-1)/2$ , except for the last table entry no 8. <sup>c</sup> The split size is calculated as:  $s = N - 1$ . <sup>d</sup> Number of different amino acid analyses possible for the library. <sup>e</sup> The degeneracy ( $D$ ) is defined as the total library size divided by the number of hydrolysis profiles ( $D = T / P$ ).

**Figure 112 :** Type de bibliothèques réalisables par cette technique d'encodage et nombre de séquences possibles pour chaque profil d'hydrolyse réalisé.

Par exemple, l'utilisation de 15 paires uniques avec 15 acides aminés permet de réaliser une bibliothèque de  $5^6 = 15625$  hexapeptides avec 5 acides aminés à chaque position. Dans cette librairie, il y a 11590 AAA possibles dont 7775 sont représentatifs de 1 seule séquence, 4005 de 2 séquences et 10 de 4 séquences, ce qui donne une très faible dégénérescence ( $D = 1.35$ ). En comparaison, la chimie combinatoire complète correspondant à des hexapeptides avec 15 acides aminés différents aurait une taille de  $15^6 = 11390625$  membres. Il y aurait 38760 AAA possibles avec en moyenne 300 séquences possibles pour chaque, ce qui donnerait une dégénérescence trop importante ( $D = 294$ ).

<sup>182</sup> N. J. A. Sloane. « The One-Line Encyclopedia of Integer Sequences. » 2006, The Triangular Numbers: <http://www.research.att.com/~njas/sequences/A000217>.

Le nombre d'acides aminés disponibles ainsi que le choix de positions déterminé pour chacun est une limite à cette technique qui ne permet pas d'obtenir une bibliothèque complète de composés. Cette limitation peut être facilement dépassée en réalisant des librairies avec un certain design par rapport à la cible visée.

### **3. Projet :**

Le travail que nous proposons consiste à réaliser des bibliothèques de peptides cycliques encodés selon la méthode décrite précédemment. Nous avons montré, en collaboration avec le Pr. Claude Cochet (CEA, Grenoble), que l'interaction entre les deux sous-unités de la Casein Kinase II (CK2), peut être inhibée par ce type de structure. Cette étude a notamment permis d'identifier les acides aminés impliqués dans cette interaction protéine/protéine. Nous avons tout d'abord élaboré une première bibliothèque de cyclodécapeptide selon un design comparable au châssis moléculaire RAFT afin de valider l'approche. Par la suite, une bibliothèque de peptides cycliques de 15 acides aminés a été synthétisée en tenant compte des considérations structurales de la CK2 dans le but découvrir de nouveaux inhibiteurs de cette interaction.

### **4. Bibliothèque de cyclodécapeptide :**

La première partie du travail a consisté à étudier la méthodologie de synthèse de peptides cycliques sur résine. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur le design des molécules RAFT et la stratégie de cyclisation sur support développée au laboratoire<sup>83</sup>. Nous avons donc synthétisés des cyclodécapeptides contenant les éléments structuraux qui favorisent la cyclisation de ce type de structure.

#### **4.1 Choix de la résine :**

La bibliothèque est synthétisée sur une résine TentaGel Macrobeads de faible loading (0,3 mmol/g), qui permet de réaliser le criblage en conditions aqueuses, en utilisant la stratégie Fmoc/tBu classique. De plus, le linker est stable dans les conditions de clivage des groupes protecteurs, ce qui permet de déprotéger les acides aminés sans décrocher le peptide de la bille. Il faut aussi signaler que les billes sont de grosses tailles afin de faciliter le prélèvement des billes actives lors des criblages.

#### **4.2 La cyclisation sur résine :**

La cyclisation n'est pas une réaction triviale en synthèse peptidique sur phase solide ou en solution, en raison des risques de cyclodimérisation ou d'oligomérisation. Toutefois, selon

une hypothèse formulée lors des premiers développements de la SPPS<sup>183</sup>, les molécules immobilisées sur support solide seraient isolées les unes des autres par un effet de « pseudo dilution<sup>184</sup> » et ne pourraient donc pas interagir entre elles. Ainsi, une réaction de cyclisation intramoléculaire d'un peptide serait favorisée en phase solide par rapport à la même réaction, à concentration comparable, en solution. Ce phénomène est renforcé par un faible taux de substitution de la résine (0.1 à 0.2 mmol/gramme), limitant ainsi les problèmes de réactivité liés à l'encombrement. Cet effet est assimilé aux conditions de haute dilution avec lesquelles nous travaillons habituellement en solution.

La nature du peptide constitue l'autre paramètre extrêmement important de ce type de réaction. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la cyclisation entre les extrémités N- et C-terminales d'un peptide en solution dépend principalement de sa séquence. Dans le cas d'un RAFT, les deux coudes  $\beta$  de type II formés par les séquences Pro-Gly induisent une conformation quasi-cyclique du peptide linéaire qui favorisent cette réaction. De la même manière, les nombreux exemples de cyclisation sur résine rapportés dans la littérature<sup>185</sup> ont montré que la présence d'une contrainte structurale dans la séquence provoque une courbure de la chaîne peptidique permettant le rapprochement de ses extrémités indispensable pour leur liaison. Le choix de l'acide aminé situé au niveau du site d'attachement du peptide sur la résine est donc primordial. Il doit, à la fois tenir compte de ces considérations structurales, mais il doit aussi posséder une chaîne latérale par laquelle il sera accroché sur le support. Notre choix s'est finalement porté vers l'utilisation du dérivé acide D-glutamique (noté q sur les schémas de synthèse) protégé par un groupement Fmoc sur sa fonction  $\alpha$ -amine et par un groupement allyl sur sa fonction acide. La chaîne latérale reste quant à elle sous sa forme libre afin de constituer le site d'attachement avec la résine. Le dérivé **62** n'étant pas disponible commercialement, nous l'avons synthétisé à partir du produit **60** (Schéma 14). L'ester allylique est obtenu à partir de la fonction acide correspondante après formation du carboxylate de césium et réaction successive avec du bromure d'allyle<sup>186</sup>. Après

---

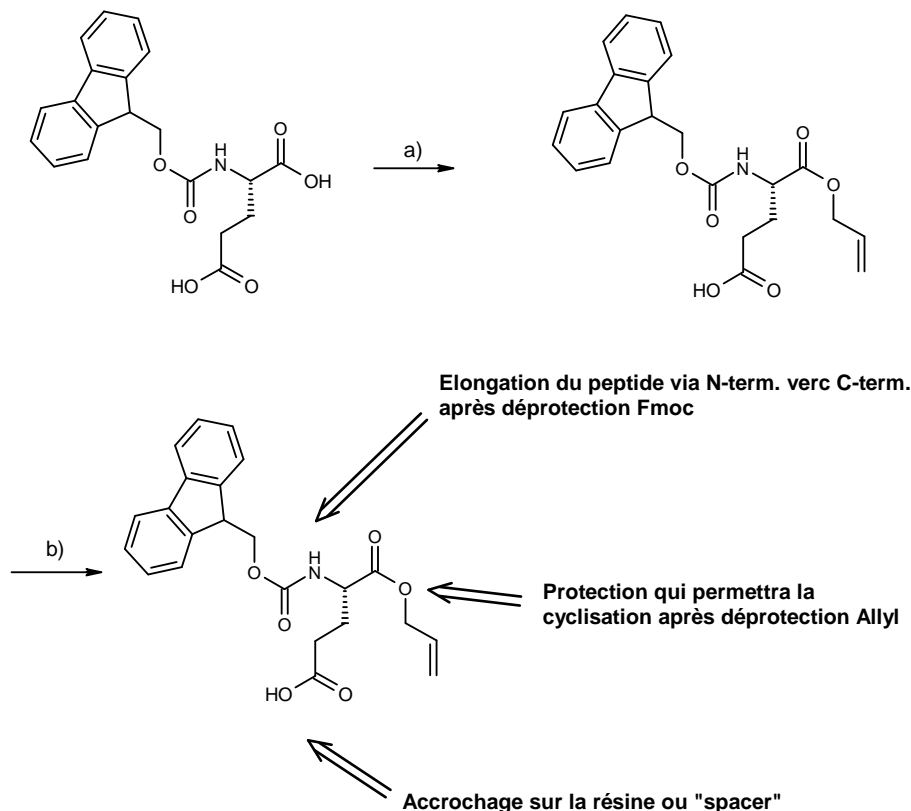
<sup>183</sup> J. I. Crowley, H. Rapoport. « Solid-Phase Organic Synthesis: Novelty or Fundamental Concept? » *Acc. Chem. Res.* **1976**, 9, 135-144.

<sup>184</sup> J. Eichler, A. W. Lucka, R. A. Houghten. « Cyclic Peptide Template Combinatorial Libraries : Synthesis and Identification of Chymotrypsin Inhibitors. » *Peptide Res.* **1994**, 7, 300-307.

<sup>185</sup> M. Lebl, V. J. Hruby. « Synthesis of Cyclic Peptides by Solid Phase Methodology. » *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2067-2068; O. Ploux, G. Chassaing, A. Marquet. « Cyclization of Peptides on a Solid Support. Application to Cyclic Analogs of Substance P. » *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 29, 162-169 ; S. Plaue. « Synthesis of Cyclic Peptides on Solid Support. Application to Analogs of Hemagglutinin of Influenza virus. » *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 510-517.

<sup>186</sup> H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt. « The Allyl Ester as a Temporary Protecting Group for the beta-Carboxy Function of Aspartic Acid. » *Int. Pept. Prot. Res.* **1985**, 26, 492-497.

déprotection du tBu dans une solution de dichlorométhane / TFA (1/1) et précipitation, le produit **62** est obtenu avec un rendement global de 57%. Ce dérivé parfaitement propre peut être accroché directement sur la résine ou sur le bras espaceur.



**Conditions:**

a) Bromure d'allyle, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O (20/1), b) TFA/DCM (1/1), 2h, rdt global = 57%

**Schéma 14** : Synthèse du dérivé acide D-glutamique nécessaire à la cyclisation sur support.

Ce dérivé sera dans notre cas inséré dans la séquence peptidique après deux β-Ala qui serviront d'espaceur entre la résine et le peptide cyclique afin de ne pas interférer sur l'activité et le domaine de reconnaissance des peptides. Elles serviront également d'étalon interne qui servira à prouver l'origine du peptide lors de l'AAA de la bibliothèque. Nous aurons donc une synthèse « mixte » dans laquelle certains acides aminés seront accrochés de façon combinatoire et d'autre seront fixes (proline, glycine et D-glutamate).

### 4.3 Synthèse et analyse de la bibliothèque L1 :

Notre première bibliothèque possède 6 positions variables et utilisent 15 acides aminés qui seront répartis en 6 splits de 5 acides aminés ce qui nous donnera 15625 séquences possibles. Ceux-ci (AA1...AA15) seront disposés sous forme de paires uniques en suivant la matrice suivante (Tableau 10).

	Split 1	Split 2	Split 3	Split 4	Split 5	Split 6
AA1	0	0	0	1	1	0
AA2	0	0	0	1	0	1
AA3	1	0	0	0	0	1
AA4	1	0	0	0	1	0
AA5	0	0	1	1	0	0
AA6	0	0	1	0	1	0
AA7	1	0	1	0	0	0
AA8	0	1	0	0	1	0
AA9	0	0	0	0	1	1
AA10	0	0	1	0	0	1
AA11	1	1	0	0	0	0
AA12	0	1	0	1	0	0
AA13	1	0	0	1	0	0
AA14	0	1	0	0	0	1
AA15	0	1	1	0	0	0
Total	5	5	5	5	5	5

**Tableau 10 :** Matrice permettant de placer les acides aminés lors de la synthèse. « 1 » correspond à la présence de l'acide aminé lors du split et « 0 » correspond à sa non-utilisation. : Splits à effectuer en suivant les coordonnées fournis par la matrice.

Les splits sont réalisés en reprenant la totalité de la résine dans un mélange de DMF et DCM (2/1), puis à l'aide d'une seringue on sépare en 5 lots équivalents de résine. La réaction de cyclisation du peptide sur la résine est l'étape clé de la synthèse. La première étape consiste à déprotéger le Fmoc terminal par la procédure classique et permet de mesurer le taux de substitution à ce moment de la synthèse (0,12 mmol/g). L'ester allylique de l'acide glutamique est à son tour éliminé, en présence de  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$  comme catalyseur et d'un large excès de phénylsilane sous atmosphère d'argon dans du dichlorométhane. Concernant l'étape de cyclisation nous utilisons du PyBOP<sup>®</sup> en présence de DIEA dans le DMF et après deux cycles de 45 minutes, les tests de Kaiser et du TNBS nous indiquent que la réaction est complète. Il suffit ensuite de déprotéger les chaînes latérales des acides aminés en utilisant une solution de TFA et d'eau, de triisopropylsilane et d'éthane dithiol comme « scavengers » pendant 3 heures (schéma 15). Enfin, la résine est lavée plusieurs fois pas du DCM et séchée au méthanol et à l'éther.

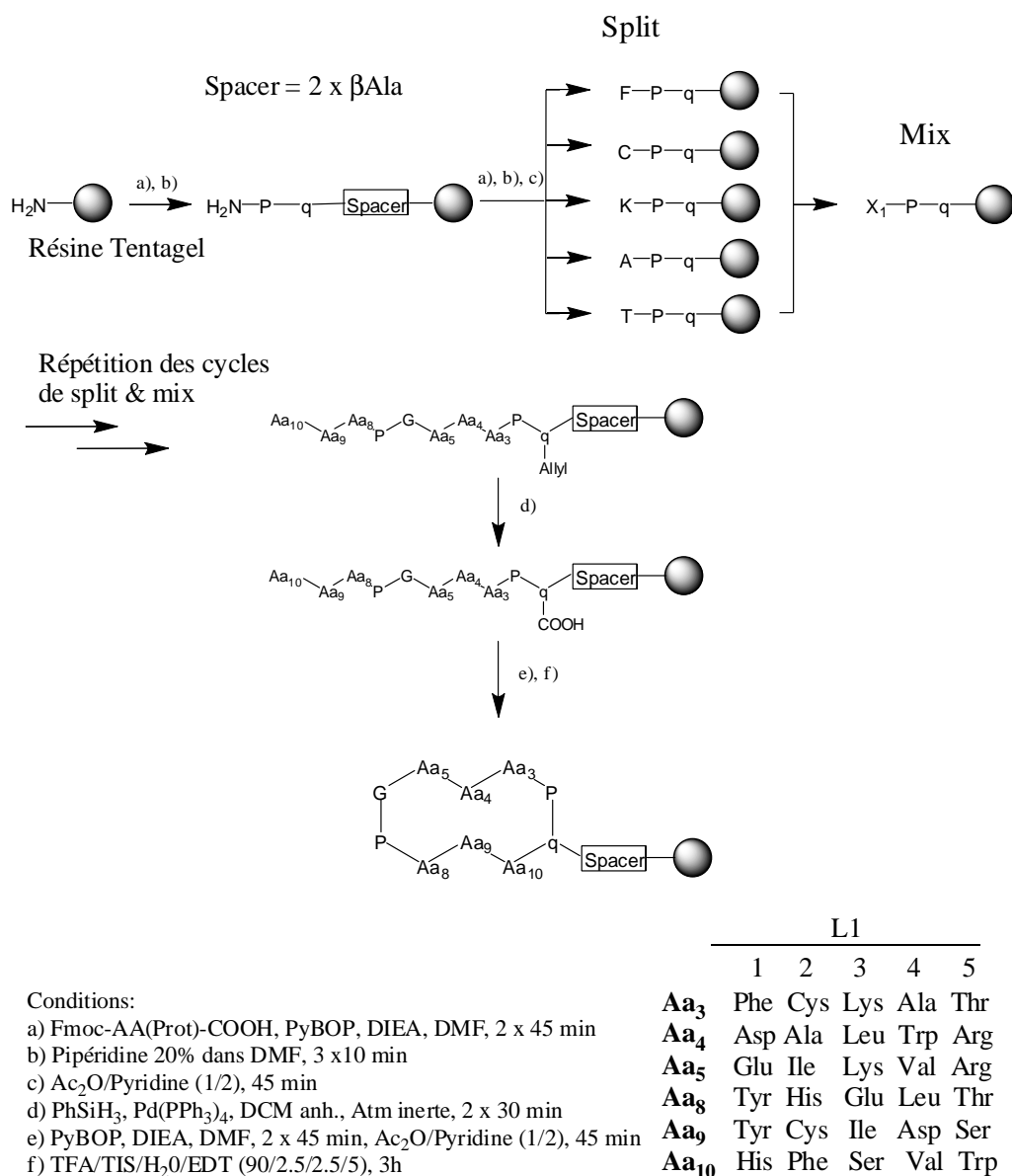


Schéma 15 : Synthèse de L1.

#### 4.3.1 Analyse d'un échantillon de la bibliothèque :

Pour confirmer que tous les acides aminés ont été incorporés de façon équitable lors de la synthèse, l'analyse en acides aminés est réalisée sur un échantillon de la bibliothèque en collaboration avec l'équipe de J.-L. Reymond.

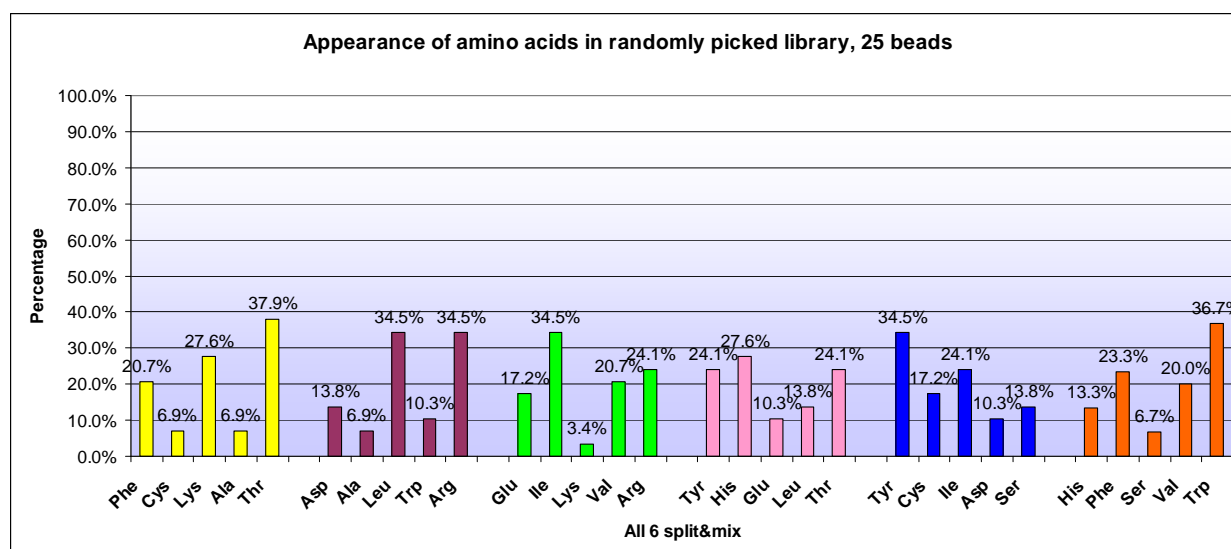
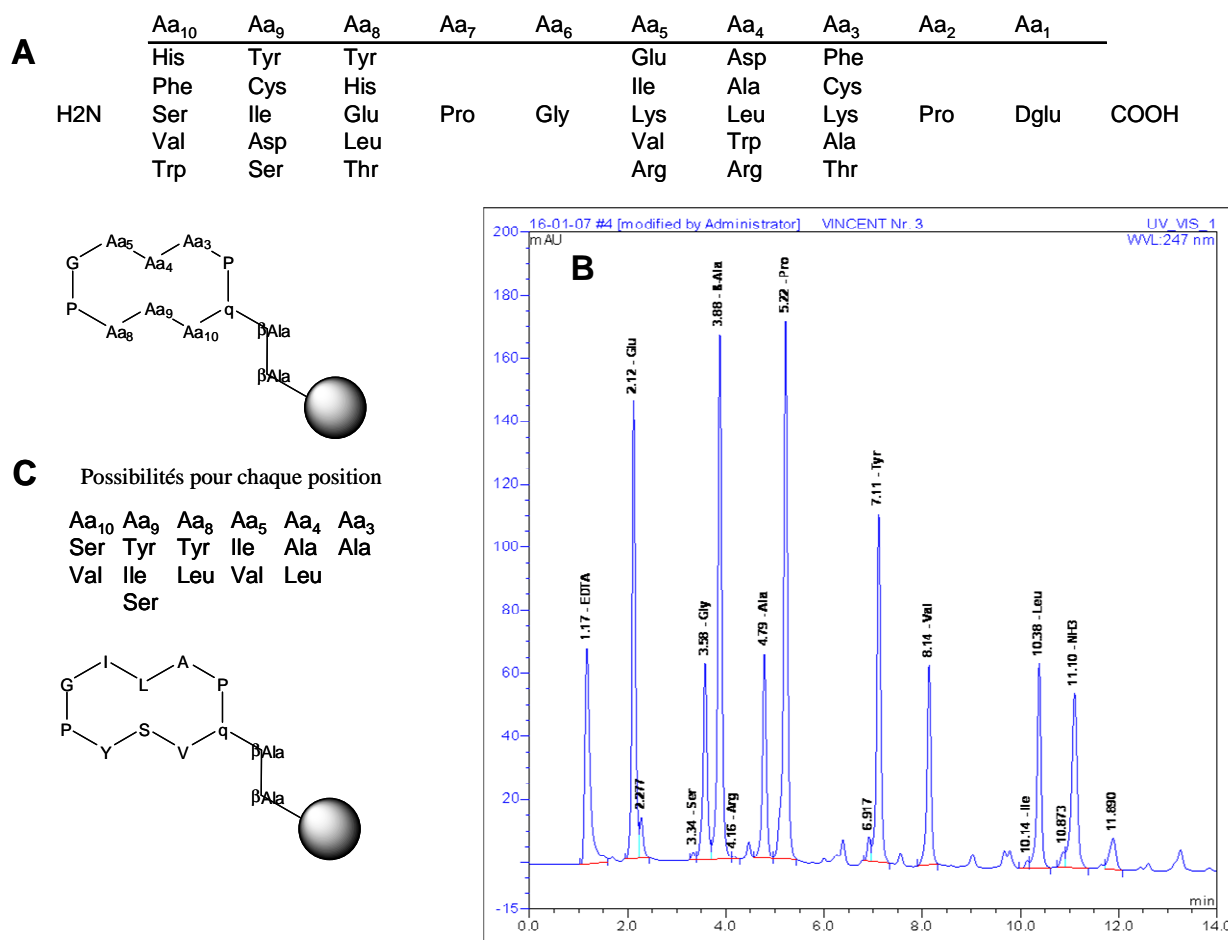


Figure 113 : Analyse en acides aminés de 25 billes de la bibliothèque.

La figure 113 représente la répartition en acides aminés d'un lot de 25 billes. Cette analyse confirme la présence dans la séquence de chaque acide aminé utilisé dans un split. Le nombre théorique attendu étant de 20%, on constate que les valeurs obtenues diffèrent sensiblement de simplement de celui-ci car le nombre de billes analysées ne représente qu'un échantillon de la bibliothèque et non pas l'ensemble de séquences possibles.

#### 4.3.2 Analyse d'une bille :

L'analyse d'une bille prélevée au hasard est donnée dans la figure 114A qui représente le profil d'hydrolyse de la séquence correspondante. Ce profil permet de confirmer la présence et d'en déduire par élimination la position dans la séquence (Fig. 114B). Dans cet exemple (Fig. 114C), l'alanine présente une seule fois ne peut être qu'en position Aa<sub>3</sub>, ce qui implique que la leucine soit en Aa<sub>4</sub> et donc que la tyrosine soit en Aa<sub>8</sub>. Un programme informatique a également été conçu pour faciliter le décodage.



**Figure 114 :** Exemple de traitement des données et obtention de la bonne séquence correspondant au profil. A. Bibliothèque formée, B. AAA obtenu pour une bille, C. Séquence obtenu par décodage.

La synthèse de L1 ayant permis de valider la méthodologie de synthèse de bibliothèques de peptides cycliques, le criblage de cette librairie a été réalisé sur une cible étudiée par l'équipe du Pr. J.-L. Reymond.

#### 4.4 Etude de L1 :

La vitamine B<sub>12</sub> a fasciné les chimistes et biologistes depuis qu'elle fut isolée et des recherches se sont focalisées sur la découverte de différents ligands des cobalamines<sup>187</sup>. Les études réalisées à Berne sur des dendrimères ont permis de montrer que des peptides contenant des cystéines et/ou des histidines sont capables de se lier à la vitamine B<sub>12</sub><sup>188</sup>. Un test a d'ailleurs été mis au point pour cribler sur support solide des bibliothèques de peptides avec cette molécule. Etant donné que dans notre librairie L1, les deux acides aminés

<sup>187</sup> S. N. Fedosov, L. Berglund, N. U. Fedosova, E. Nexø, T. E. Petersen. « Comparative Analysis of Cobalamin Binding Kinetics and Ligand Protection for Intrinsic Factor, Transcobalamin, and Haptocorrin. » *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 9989-9996.

<sup>188</sup> A. Clouet, T. Darbre, J. L. Reymond. « Combinatorial Approach to Catalytic Peptide Dendrimers. » *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 4612-4615.

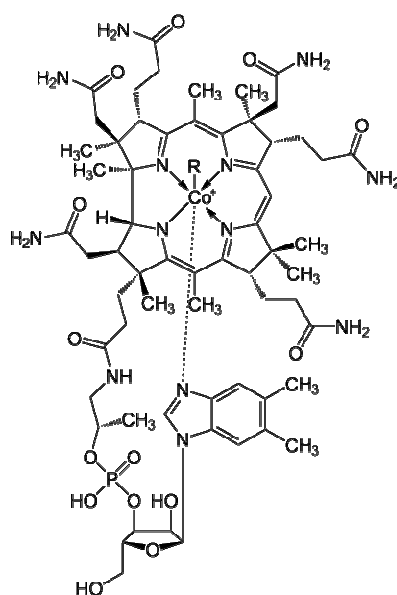


impliqués dans l'interaction sont présents, nous avons décidé de réaliser ce criblage avec la vitamine B<sub>12</sub>.

#### 4.4.1 La vitamine B<sub>12</sub> :

- *Historique* : en 1926, Georges Minot et William Murphy observaient qu'on peut corriger l'anémie pernicieuse (réputée incurable et généralement fatale) en imposant un régime très riche en tissu hépatique. Le facteur curatif est la vitamine B<sub>12</sub>.

- *Structure* : contrairement à quelques espèces bactériennes, la vitamine B<sub>12</sub>, aussi appelée cobalamine, n'est synthétisée ni par les animaux ni par les plantes. En 1948, on parvint à l'isoler sous la forme du dérivé cyano cristallin rouge. Une dizaine d'années plus tard, la cristallographie par les rayons X et l'analyse chimique permirent à Dorothy C. Hodgkin d'élucider la structure des cobalamines (Fig. 115). Elles possèdent une structure chimique proche de l'hème mais l'atome central de fer est remplacé par un atome de cobalt, d'où le nom de cobalamines. Cette étude a mis en évidence la position des deux ligands axiaux du cobalt, un ribonucléotide de benzimidazole (Bzm) sous l'atome de cobalt et un groupe R au-dessus de l'atome de cobalt. Parmi les différentes formes identifiées, la cyanocobalamine (R = CN) et l'hydroxocobalamine (R = OH) nous intéressent plus particulièrement.



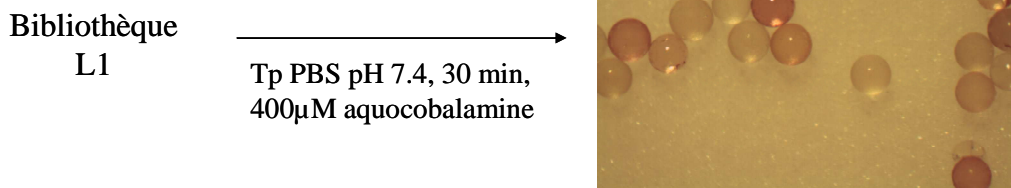
**Figure 115** : Structure générale des cobalamines. Cyanocobalamine (R=CN), Méthylcobalamine (R=Me), hydroxocobalamine ou aquocobalamine (R=OH).

- *Adsorption* : l'absorption de la vitamine B<sub>12</sub> nécessite la présence d'acide chlorhydrique ainsi que l'association à une substance sécrétée par la muqueuse de l'estomac (le facteur intrinsèque). Elle peut ensuite être stockée par l'organisme dans le foie, le pancréas, le coeur et le cerveau. La vitamine B<sub>12</sub> peut être absorbée via 2 mécanismes : un mécanisme actif et un passif. Lors du mécanisme actif, la B<sub>12</sub> présente dans les aliments est liée à des protéines (haptocorrines) dont elle se sépare sous l'action de l'acidité de l'estomac et d'enzymes. Une fois détachée de la protéine, elle doit se lier au facteur intrinsèque pour passer dans le sang. L'absorption en vitamine B<sub>12</sub> est diminuée si l'une des deux étapes est ralentie ou empêchée. Lorsque la vitamine B<sub>12</sub> est apportée en concentration élevée (suite à la prise d'un comprimé par exemple), un mécanisme passif permet de l'absorber. Ce mécanisme passif ne requiert pas la présence du facteur intrinsèque pour fonctionner.

- *Carence* : la carence en B<sub>12</sub> est souvent associée à un problème d'absorption. Les personnes atteintes d'anémie pernicieuse (ou anémie de Biermer) ne sécrètent pas le facteur intrinsèque, une glycoprotéine produite par la muqueuse gastrique, indispensable à l'absorption de la vitamine B<sub>12</sub>. Cette glycoprotéine fixe en effet sélectivement la vitamine B<sub>12</sub> et seul le complexe facteur intrinsèque-vitamine B<sub>12</sub> est absorbé par les cellules de l'intestin grêle. Une des caractéristiques de cette anémie est la présence de globules rouges fortement augmentés en taille.

#### **4.4.2 Criblage sur l'aquocobalamine :**

Le criblage et la détermination des séquences actives de cette bibliothèque a été réalisé à l'Université de Berne dans le laboratoire du Pr. J.-L. Reymond. Après une étape conditionnement de la résine dans le tampon PBS (10 mM en phosphate, 160 mM en NaCl, pH 7.4), une quantité de billes assurant la représentation totale de chaque peptide (70 mg de billes soit environ 70 000 billes) de la librairie est mises en présence d'une solution d'aquocobalamine à 400 µM. Après 30 minutes, des lavages avec le tampon PBS puis de l'eau sont réalisés et la coloration rouge des billes permet d'identifier les séquences actives de la bibliothèque (Fig. 116).



**Figure 116 :** Criblage de L1 sur l'aquocobalamine. Les billes positives deviennent rouges.

Les billes colorées sont isolées à l'aide d'un microscope puis soumises à un traitement à l'acide chlorhydrique 6N pour permettre l'AAA. Les séquences actives identifiées selon la méthode d'encodage décrite précédemment, sont données dans le tableau suivant.

Hit	Aa <sub>10</sub>	Aa <sub>9</sub>	Aa <sub>8</sub>	Aa <sub>7</sub>	Aa <sub>6</sub>	Aa <sub>5</sub>	Aa <sub>4</sub>	Aa <sub>3</sub>	Aa <sub>2</sub>	Aa <sub>1</sub>
<b>63</b>	His	Ile	Thr	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	D-Glu
<b>64</b>	His	Asp	Glu	Pro	Gly	Ile	Ala	Thr	Pro	D-Glu
<b>65</b>	Val	Asp	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	Pro	D-Glu
<b>66</b>	His	Cys	Thr	Pro	Gly	Glu	Leu	Ala	Pro	D-Glu
<b>67</b>	Val	Ile	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	Pro	D-Glu
<b>68</b>	Val	Ile	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	D-Glu

**Tableau 11 :** Séquences actives à resynthétiser.

Les peptides contiennent soit une histidine (**63** et **64**), soit une cystéine (**67**) soit les deux (**66**) sauf le **68** qui ne contient aucun des deux résidus. Ce dernier peptide est utilisé comme témoin négatif.

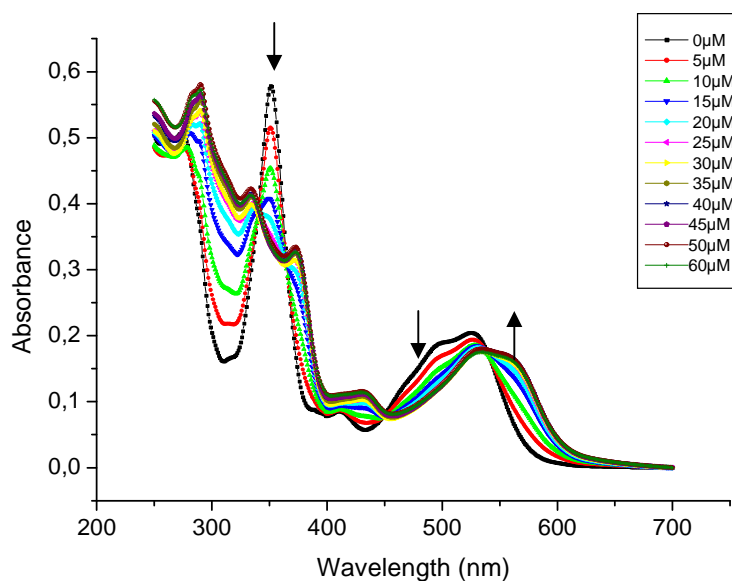
#### 4.4.3 Resynthèse des séquences actives :

Les séquences présentant une activité sont resynthétisées sur une résine Rink Amide MHBA (loading = 0.7 mmol/g) selon une stratégie Fmoc/*t*Bu à l'aide d'un synthétiseur de peptides sur la plate forme Synthèse NANOBIO à Grenoble. Ensuite, la cyclisation de chaque peptide est réalisée selon la même procédure que lors de la synthèse en split and mix. Il nous a également semblé intéressant de synthétiser et tester les séquences linéaires correspondante (**63'**, **64'**, **65'**, **66'**, **67'**, **68'**) et une séquence linéaire acétylé en N-terminal (**65''**). Les peptides cycliques et linéaires sont obtenus sous forme de poudre blanche après purification par CLHP semi-préparative avec des rendements allant respectivement de 35 à 90% et de 20 à 82%. Tous ces produits ont été caractérisés par CLHP analytiques et spectrométrie de masse ESI.

#### 4.4.4 Titration de l'aquocobalamine :

Des expériences de titration entre les peptides sélectionnés et l'aquocobalamine sont ensuite réalisées pour déterminer l'affinité correspondante. Pour cela, nous mesurons le spectre d'absorption de l'aquocobalamine (250-700 nm) en présence de concentrations variables des peptides. Les ajouts successifs de peptides à la solution d'aquocobalamine à 25  $\mu\text{M}$  dans le tampon HEPES au temps d'équilibre se caractérisent par des modifications du spectre d'absorption liés à des changements de la sphère de coordination du cobalt. Du fait de la faible association entre OH et le Cobalt, il a été montré que des ligands de différentes nature comme les imidazoles ( $K_D = 10^{-4}$  M), les cyanos ( $K_D < 10^{-12}$  M), les cystéines ou la glutathione ( $K_D = 10^{-6}$  M) sont capables de substituer l'hydroxyle axial de la cobalamine<sup>189</sup>. Selon la séquence des peptides, on observe deux types modification spectrale.

- *Peptides contenant des cystéines* : comme le montre la figure 117, le spectre d'absorption subit des changements significatifs au niveau de plusieurs zones.

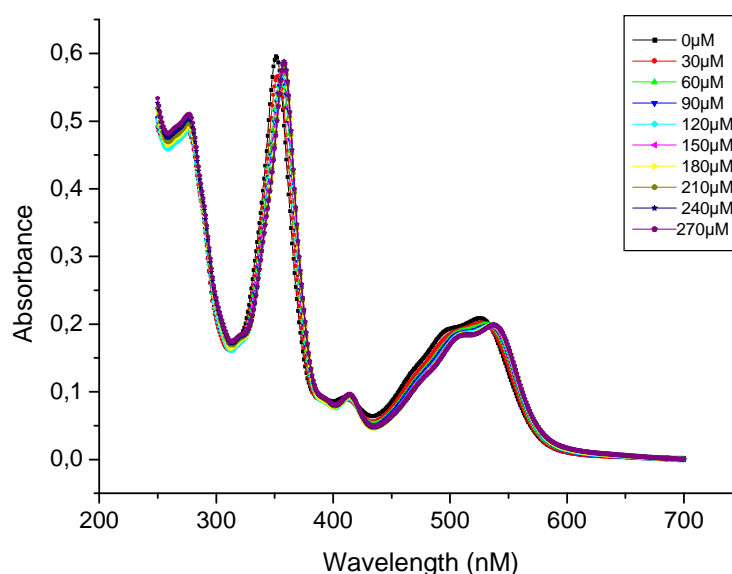


**Figure 117 :** Titration de l'aquocobalamine par le peptide 67.

<sup>189</sup> a) J. M. Pratt. « Inorganic Chemistry of Vitamin B12. » *Academic Press*, London, New York **1972**; b) S. N. Fedosov, L. Berglund, E. Nexø, T. E. Petersen. « Tetrazole Derivatives and Matrices as Novel Cobalamin Coordinating Compounds. » *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 1234-1242.

En particulier, le pic à 350 nM diminue au fur et à mesure de l'ajout du peptide et cette évolution est caractéristique des titrations de l'aquocobalamine<sup>190</sup> par les dérivés thiols. Ces changements nous permettent de mettre en évidence la substitution d'un des deux ligands axiaux de la cobalamine par la cystéine, très probablement le groupement OH qui est beaucoup plus facile à échanger au pH utilisé lors de l'expérience.

- *Peptides contenant des histidines* : pour les peptides contenant des histidines, le temps d'équilibre entre deux ajouts de peptide est beaucoup plus long (environ 7 heures) et ceux-ci doivent être plus concentrés (25  $\mu$ M). Ceci pourrait signifier un mécanisme de substitution d'un ligand du Co différent.



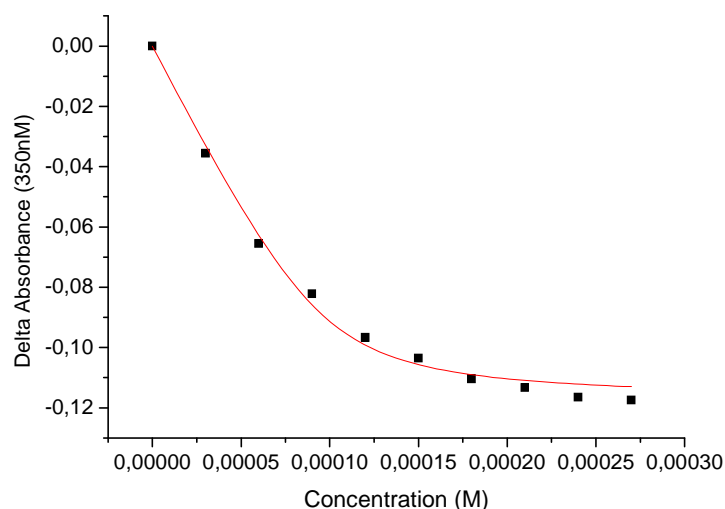
**Figure 118** : Titration de l'aquocobalamine par le peptide **64**.

De plus, le changement spectral est beaucoup plus nuancé que dans le cas précédent. En effet, le pic à 350 nM subit une légère diminution associée à un déplacement hypsochrome (Fig. 118). Si on considère que le groupement hydroxyle est le ligand du cobalt le plus labile, cet effet pourrait être significatif de sa substitution par l'histidine. On pourrait également supposer que la substitution du Bzm par l'histidine, deux molécules de même nature chimique, pourrait induire un changement spectral de ce type. En effet, il a été montré que présence d'une concentration importante d'imidazole, comme dans le cas de cette expérience,

<sup>190</sup> N. Adler, T. Medwick, T. J. Poznanski. « Reaction of Hydroxocobalamin with Thiols. » *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 5018-5020.

le substituant Bzm peut être lui aussi remplacé avec une affinité et une vitesse inférieure<sup>191</sup>. Ces aspects seront étudiés plus en détail au cours d'analyse en RMN à une et deux dimensions.

- *Analyse des résultats* : en représentant la différence d'absorption du pic à 350 nM en fonction de la concentration en peptides, nous obtenons une courbe permettant d'obtenir la valeur de la constante d'association du complexe cobalamine/peptide<sup>192</sup> (Fig. 119).



**Figure 119** : Analyse du complexe aquocobalamine/peptide **64**.

Les résultats obtenus pour tous les complexes sont représentés dans le tableau suivant :

Peptides	Constante d'association (M)	Temps d'équilibre
<b>63</b>	$6.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$	420 minutes
<b>63'</b>	$1.4 \times 10^6 \pm 4.7 \times 10^5$	420 minutes
<b>64</b>	$5.8 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	420 minutes
<b>64'</b>	$4.5 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^6$	420 minutes
<b>65</b>	$1.3 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5$	75 minutes
<b>65'</b>	$1.6 \times 10^6 \pm 5.7 \times 10^5$	270 minutes
<b>65''</b>	$1.3 \times 10^6 \pm 8.0 \times 10^5$	270 minutes
<b>66</b>	$3.2 \times 10^6 \pm 9.5 \times 10^5$	75 minutes
<b>66'</b>	x	x

<sup>191</sup> S. N. Fedosov, L. Berglund, E. Nexø, T. E. Petersen. « Tetrazole Derivatives and Matrices as Novel Cobalamin Coordinating Compounds. » *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 1234-1242.

<sup>192</sup> H. Bakirci, X. Zhang, W. M. Nau. « Induced Circular Dichroism and Structural Assignment of the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Bicyclic Azoalkanes. » *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 39-46.

<b>67</b>	$1.2 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$	300 minutes
<b>67'</b>	$1.9 \times 10^6 \pm 8.0 \times 10^5$	180 minutes
<b>68</b>	×	×
<b>68'</b>	×	×

**Tableau 12 :** Valeurs des constantes d'association obtenues pour chacun des complexes aquocobalamine/peptide.

On remarque que les  $K_A$  obtenus sont du même ordre de grandeur que le peptide soit cyclique ou sous sa forme linéaire. D'après ces résultats, les peptides contenant une cystéine ont globalement une meilleure constante d'association ainsi qu'un temps d'équilibre plus faible que ceux contenant une histidine. Le peptide **68** ne contenant pas de cystéine ni d'histidine a engendré aucune modification du spectre de l'aquocobalamine, ce qui confirme l'importance de ces résidus dans l'interaction. De plus, les constantes obtenues de l'ordre de  $10^6$  M sont comparables à celle du complexe modèle glutathione/cobalamine<sup>193</sup> très stable, ce qui semble confirmer que nos peptides sont de très bons ligands de la cobalamine. Une expérience intéressante supplémentaire consisterait à étudier la stabilité de nos complexes peptide/cobalamine à différents pH et en présence de glutathione.

#### 4.4.5 Etudes structurales :

Une étude structurale par RMN et modélisation devrait permettre d'étudier plus en détail le mode d'interaction entre les peptides et l'aquocobalamine. En effet, les expériences de titration réalisées ont suggéré que ce mécanisme d'interaction pourrait être différent selon la présence de cystéine ou d'histidine dans les peptides.

Pour étudier en détails le mode de complexation des peptides avec l'aquocobalamine, nous avons réalisés des études de RMN à deux dimensions. Nous avons effectué ces expériences avec le Pr. Julian Garcia. Dans un premier temps, nous avons formé le complexe entre le peptide **65** et l'aquocobalamine (HO-Cbl) à une concentration de 2 mM puis réalisé les spectres NOESY, TOCSY et COSY de celui-ci ainsi que du peptide et de l'aquocobalamine seuls. Un modèle du complexe peptide/OH-Cbl a été proposé à partir de cette étude RMN.

<sup>193</sup> a) R. K. Suto, N. E. Brasch, O. P. Anderson, R. G. Finke. « Synthesis, Characterization, Solution Stability, and X-ray Crystal Structure of the Thiolatocobalamin  $\gamma$ -Glutamylcysteinylcobalamin, a Dipeptide Analogue of Glutathionylcobalamin: Insights into the Enhanced Co-S Bond Stability of the Natural Product Glutathionylcobalamin. » *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2686-2692. b) Nicola E. Brasch, Tsui-Ling Carolyn Hsu, Kenneth M. Doll and Richard G. Finke. « Synthesis and Characterization of Isolable Thiolatocobalamin Complexes Relevant to Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent Ribonucleoside Triphosphate reductase. » *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *76*, 197-209.

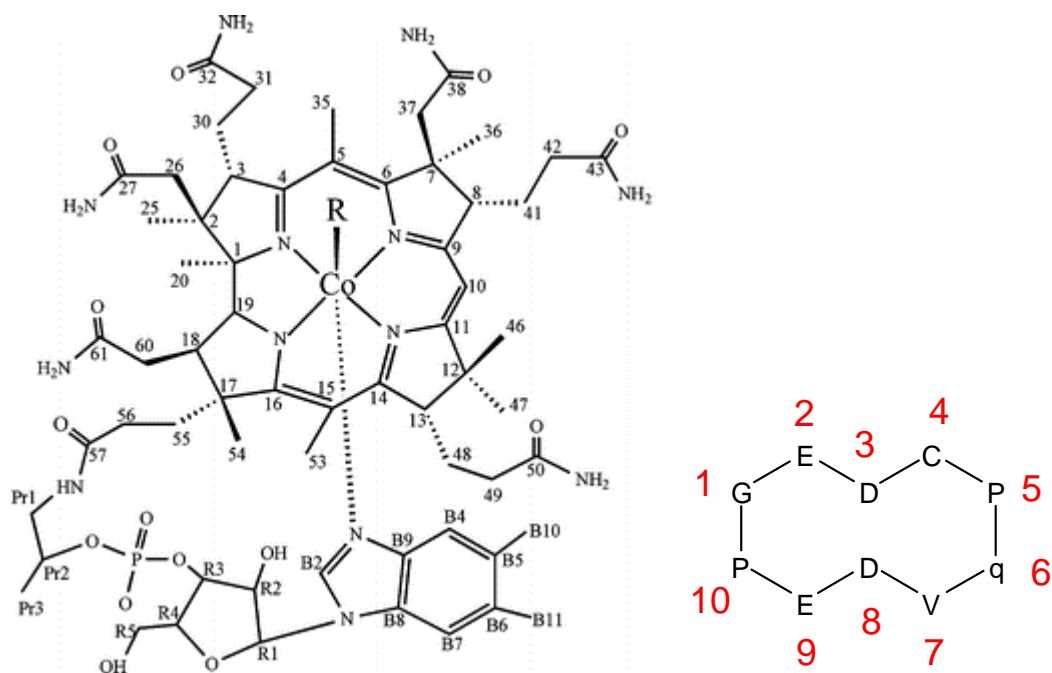
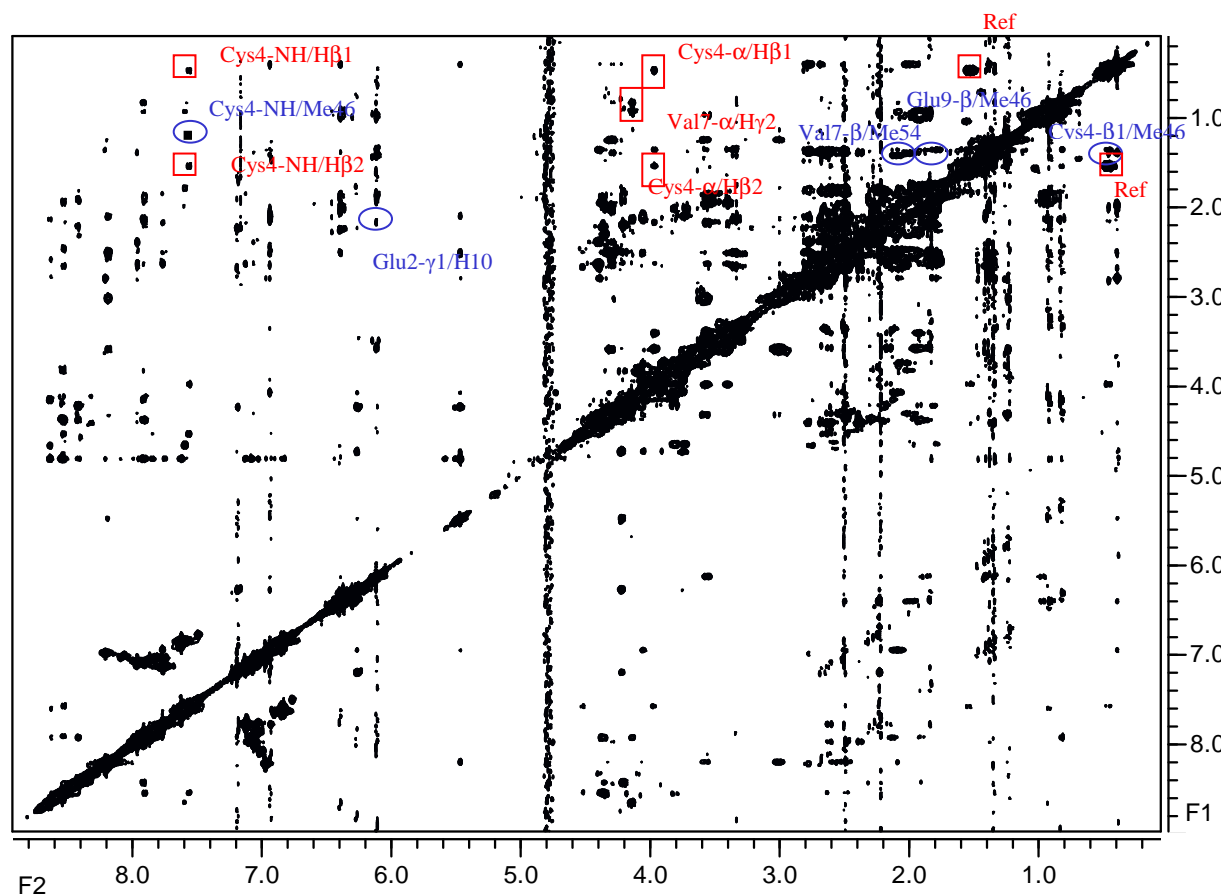


Figure 120 : Structure et numérotation de l'aquo-cobalamine et du peptide étudié 65.

#### 4.4.5.1 Détermination du modèle :

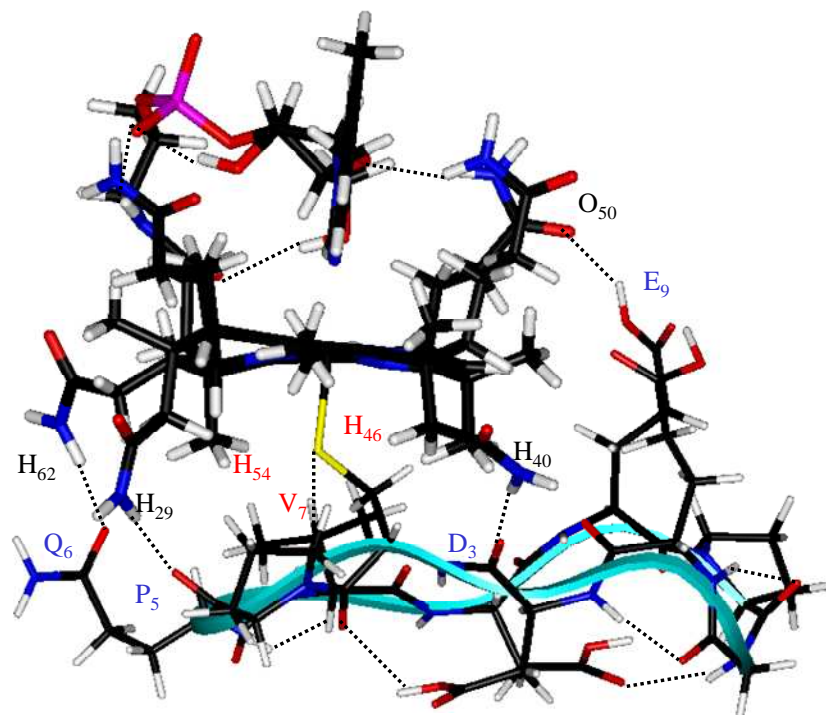
Tout d'abord, l'identification des signaux des différents acides aminés du peptide a été réalisée par attribution séquentielle. Particulièrement, les déplacements chimiques des protons de la cystéine ont été les premiers à attirés notre attention. En effet, pour confirmer, comme nous l'avons supposé auparavant, que le peptide se liait à l'aquocobalamine par la cystéine nous avons attribué les signaux de celle-ci et particulièrement les  $H_{\beta}$  qui sont caractéristiques de cet acide aminé. En comparant les données de déplacement chimique de la cystéine du peptide seul (3.28 et 2.96 ppm) et ceux obtenus dans le complexe (1.5 et 0.46 ppm, Fig. 121), on s'aperçoit que ceux-ci ont subi un fort blindage. Cette observation confirme le fait que l'environnement de la cystéine a changé et que celle-ci est impliquée dans une interaction avec le cobalt. En effet, seul l'effet inductif fortement donneur du cobalt et son anisotropie magnétique permettent d'expliquer un tel blindage de ces protons (Cys4- $H_{\beta}$ , Fig. 121). Nous avons ensuite déterminé des distances intramoléculaires spécifiques à la cystéine afin de figer sa conformation et de restreindre ainsi l'espace conformationnel de la cobalamine autour de la liaison soufre-cobalt. Nous avons obtenu quatre contraintes de distance Cys4- $H_{\beta}$  / Cys4- $H_{\alpha}$  et Cys4- $H_{\beta}$  / Cys4-NH. Dans un second temps, nous avons cherché et identifié des interactions intermoléculaire peptide-cobalamine. La difficulté de ce travail est essentiellement liée au fort taux de recouvrement des signaux aussi bien du peptide que de la cobalamine





**Figure 121:** Spectre NOESY dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10) du complexe entre le peptide 65/HO-Cbl. Les NOE intramoléculaires sont représentées en rouge et les NOE intermoléculaires en bleues.

Nous avons néanmoins déterminé, sans ambiguïté, et mesuré cinq distances intermoléculaires impliquant des protons suffisamment éloignés les uns des autres pour que le modèle présenté nous paraisse fiable (Fig. 122). Le résultat obtenu par minimisation sous contraintes n'a montré aucune violation des distances supérieure à 0.1 Å, ce qui nous a conforté dans la fiabilité du modèle.



**Figure 122** : Modèle du complexe peptide **65**/HO-Cbl obtenu après minimisation sous contraintes. Les pointillés représentent les liaisons hydrogènes. Les interactions de type van der waals sont représentées en rouge.

#### 4.4.5.2 Analyse du modèle :

La stabilité de ce modèle peut se justifier aisément par la présence de nombreuses liaisons hydrogène aussi bien intra- qu'inter-moléculaires. Notons la participation active de la fonction carboxylique de l'acide glutamique E9 et des groupements carbonyles de la glutamine q6, de l'acide aspartique D3 et de la proline P5 avec respectivement O50, H62, H40 et H29 de la cobalamine. Nous observons également des interactions de types van der waals entre les deux méthyles de la valine 7 et les deux méthyles Me-54 et Me-46 de la cobalamine situés chacun à très courte distance de cette valine.

Par ailleurs, la même étude a été réalisée sur le peptide **64** contenant une histidine. Contrairement à ce que nous avons supposé d'après l'étude des spectres d'absorption réalisés au cours de la titration, le noyau Bzm de la face inférieure ne semble pas déplacé par l'histidine. En effet, il n'a été observé aucune différence concernant ce noyau en comparant les spectres RMN du complexe cobalamine/peptide **64** et de la cobalamine seule. D'après ces premiers résultats, il semblerait que la complexation du cobalt se déroule de la même manière que le peptide contienne une cystéine ou une histidine. Des études complémentaires en cours de réalisation permettront de proposer un modèle de complexe obtenu.

#### **4.4.6 Criblage sur la Cyanocobalamine :**

La bibliothèque L1 a également été testée sur la cyanocobalamine selon la même procédure (paragraphe 4.4.2). Cette cobalamine présente la particularité d'avoir un cyano en position axial qui est très difficile, voire impossible à substituer. Les seules substitutions possibles seront donc sur le bzm axial sur la face inférieure, phénomène qui n'a jamais été montré avec des molécules synthétiques.

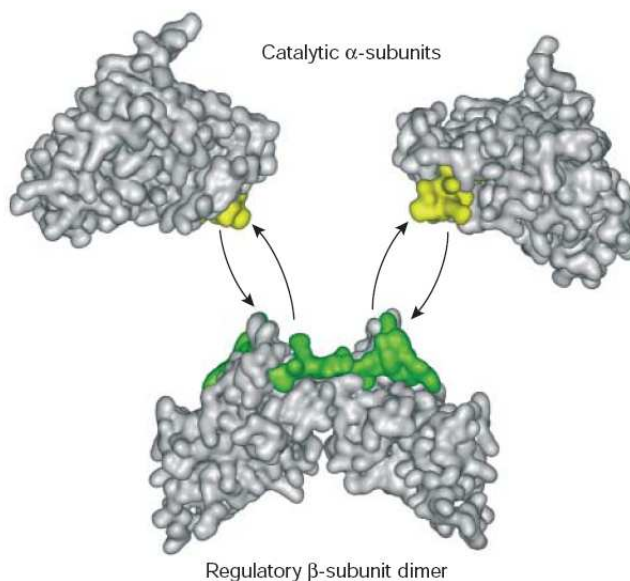
Des séquences actives faisant partie de notre librairie ont été découvertes au cours du criblage. Malheureusement, après la synthèse de ces séquences, l'étude réalisée pour l'instant par spectrométrie UV ne semble pas montrer d'activité apparente. Des études en RMN seront faites prochainement afin de vérifier ces observations.

### **5. Bibliothèque cyclique de 15 acides aminés :**

Maintenant que nous avons validé la méthodologie de synthèse de bibliothèques de peptides cycliques sur résines, nous nous sommes intéressés à des peptides de plus grande taille. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. C. Cochet (CEA Grenoble), une seconde bibliothèque a été conçue pour cibler l'interface de contact entre les deux sous unités de la protéine kinase CK2. Des études préliminaires sur des peptides cycliques ont permis d'avoir un design précis des molécules que l'on souhaite obtenir.

#### **5.1 La Casein Kinase II :**

Les nombreux arguments qui plaident en faveur du potentiel oncogénique de la protéine kinase CK2 en font une cible thérapeutique prometteuse en cancérologie. Cette protéine kinase se présente sous la forme d'un complexe de deux sous-unités catalytiques CK2 $\alpha$  constitutivement actives et d'un dimère de sous-unités régulatrices CK2 $\beta$  (Fig. 123).



**Figure 123** : Représentation des sous unités catalytiques et régulatrices de la CK2.

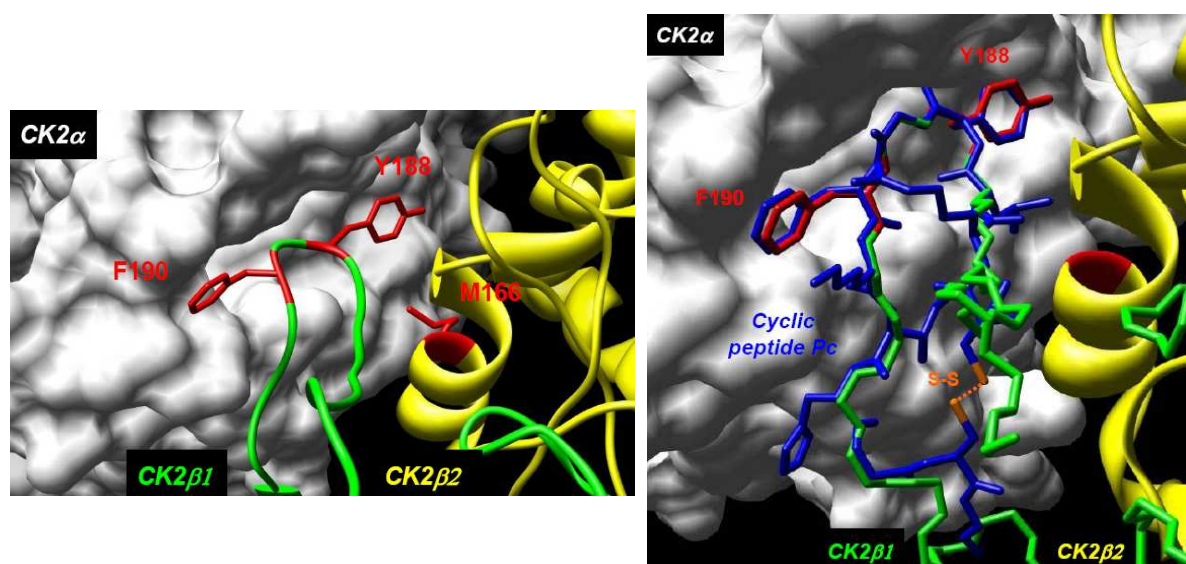
Dans le laboratoire du Pr. C. Cochet, il a été montré que l'interaction dynamique entre ces sous-unités dans la cellule est une composante essentielle dans la régulation de cette enzyme. Pour mieux comprendre cette régulation dans les processus cellulaires normaux et pathologiques, il apparaît nécessaire de développer des molécules capables de perturber cette interaction protéine-protéine. Pour cela, trois étapes complémentaires ont été utilisées : i) caractérisation des « hot spots » de l'interaction CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  à partir de la structure cristallographique du tétramère ; ii) conception rationnelle du premier ligand antagoniste de cette interaction sous la forme d'un peptide cyclique ; iii) conception d'une bibliothèque de peptides cycliques selon le design du ligand peptidique précédent. Ce dernier point constitue l'étude que nous avons explorée par chimie combinatoire.

## 5.2 Caractérisation des « hot spots » :

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle fondamental dans les voies de signalisation qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires. On peut décrire dans de nombreux cas, les interfaces protéine-protéine comme étant généralement larges (typiquement 1300 à 3000 Å<sup>2</sup>) et leurs surfaces comme compactes, hydrophobes et relativement planes<sup>194</sup>. La combinaison des analyses cristallographiques et de la mutagenèse dirigée a révélé la présence au niveau de ces interfaces, d'acides aminés essentiels (« hots spots ») pour l'interaction. Ces hots spots sont quasiment à eux seuls responsables de la force de l'interaction entre les deux partenaires.

<sup>194</sup> L. Lo Conte, C. Chothia, J. Janin. « The Atomic Structure of Protein-protein Recognition sites. » *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2177-2198; I. M. A. Nooren, J. M. Thornton. « Structural Characterization and Functional Significance of Transient Protein-protein Interactions. » *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 991-1018.

Dans le cas de la protéine CK2, les hot spots responsables de l'interaction entre les sous unités catalytiques et régulatrices ont été découverts par l'équipe du Pr. C. Cochet<sup>195</sup> (CEA – Grenoble). La structure haute résolution de la CK2 a révélé qu'un ensemble de résidus hydrophobes présent sur la sous unité  $\beta$  correspond au hot spot de cette sous unité. Cette séquence contenant les résidus hydrophobes est : <sup>186</sup>RLYGFKIH<sup>193</sup> formant une de boucle qui s'insèrent parfaitement dans la région de la sous unité  $\alpha$  (Fig. 124, gauche). De plus, grâce à la technique d'Ala-scanning, il a été possible d'identifier les acides aminés de cette séquence essentiels à l'interaction avec la sous unité  $\alpha$ . Ceux-ci correspondent à l'enchaînement Y-G-F. La figure de gauche représente la poche d'interaction de CK2 $\alpha$  en interaction avec la boucle de CK2 $\beta$ . On remarque que les cycles phénol et phényle de la tyrosine et de la phénylalanine sont orientés de façon opposés mais planaires.



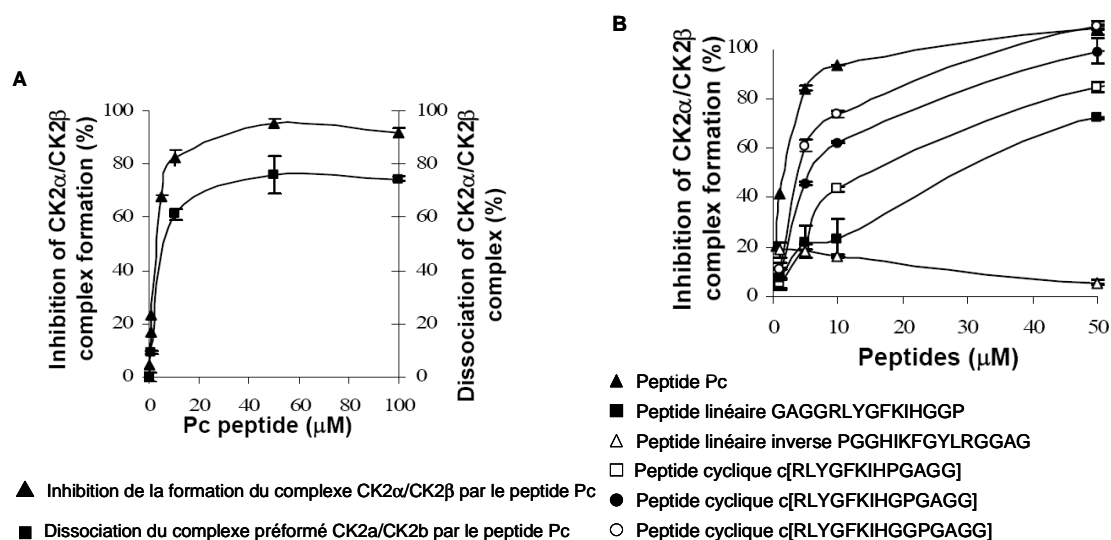
**Figure 124 :** Hot spots de la sous unité  $\beta$  formant une boucle en interaction avec la sous unité  $\alpha$  (gauche). Correspondance entre le peptide cyclique (bleu) et la région de la sous unité  $\beta$  (vert) (droite).

### 5.3 Conception rationnelle d'un inhibiteur peptidique :

Des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine possèdent plusieurs avantages par rapport aux autres classes d'inhibiteurs. L'extrême complémentarité des interfaces protéine-protéine offre la possibilité de développer des inhibiteurs hautement spécifiques et par là d'éviter au niveau cellulaire, de toucher des cibles non-spécifiques. Une étude de modélisation moléculaire s'appuyant sur les résultats précédents a permis d'élaborer un peptide cyclique (Pc) permettant de mimer la région de reconnaissance de la sous unité  $\beta$ . Ce peptide contient la

<sup>195</sup> L. Chantalat, D. Leroy, O. Filhol, A. Nueda, M. J. Benitez, E. M. Chambaz, C. Cochet, O. Dideberg. « Crystal Structure of the Human Protein Kinase CK2 Regulatory Subunits Reveals its Zinc Finger-mediated Dimerization. » *EMBO J.* **1999**, *18*, 2930-2940.

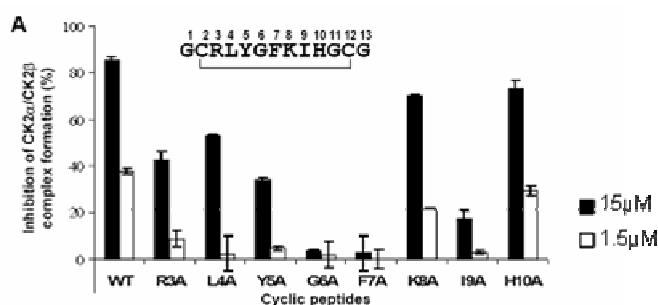
séquence essentielle **RLYGFKIH** ainsi que trois glycines et sera cyclisé via deux cystéines : Gc(**C**R**L**Y**G**F**K**I**H**G**C**)G. Comme on le voit sur le Figure 124 (droite), la structure du peptide cyclique (bleu) est superposée à celle de la boucle de CK2 $\beta$  (vert) par modélisation. On voit clairement l'analogie entre les deux structures, ce qui semble indiquer que le peptide devrait mimer parfaitement la région de CK2 $\beta$ . L'activité biologique fut ensuite évaluée par un test dans lequel la CK2 $\beta$  est fixée sur une plaque multipuits puis de la CK2 $\alpha$  marquée par la méthionine  $^{35}\text{S}$  est rajoutée en présence du peptide. La radioactivité mesurée est d'autant plus faible que le peptide se lie efficacement à la CK2 $\alpha$ . Il est ainsi possible d'évaluer le taux de dissociation du complexe CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  ou le taux d'inhibition de la formation du complexe selon si la CK2 $\alpha$  est rajoutée en premier lors du test (figure 125A). On observe que la présence du peptide Pc inhibe fortement la formation du complexe ( $\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$ ). De plus, une dissociation du complexe est observée en présence du peptide Pc ( $\text{IC}_{50} = 6,5\mu\text{M}$ ). Ces expériences nous ont amenés à collaborer avec l'équipe de Claude Cochet dans le but de synthétiser d'autres peptides plus affins<sup>196</sup>. Les peptides que nous avons synthétisés reprennent tous la séquence « hots spots ». De plus, la taille du cycle ayant une incidence sur la forme de la boucle, nous avons choisi plusieurs séquences plus ou moins longues. Enfin, leur cyclisation se fait via une liaison peptidique classique car le pont disulfure du peptide Pc est peu stable dans les conditions des tests in vivo.



**Figure 125** : A. Activité du peptide Pc sur l'association et la dissociation du complexe CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$ . B. Inhibition de la formation du complexe CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  par différents peptides.

<sup>196</sup> B. Laudet, C. Barette, V. Dulery, O. Renaudet, P. Dumy, A. Metz, R. Prudent, A. Deshiere, O. Dideberg, O. Filhol, C. Cochet. « Structure-based Design of Small Peptide Inhibitors of Protein-kinase CK2 Subunit Interaction. » *Biochem. J.* **2007**, in press.

On voit que le peptide de 15 acides aminés présente une activité comparable au Pc (Fig. 125B). Par ailleurs, deux peptides linéaires correspondants à la séquence de ce peptide et à sa séquence inversée ont été testés. On voit clairement que la séquence inversée ne présente pas d'activité alors que le linéaire présente une activité moins importante ( $IC_{50} = 30 \mu M$ ) que la forme cyclisée. Ces deux informations nous confirment donc que la structure cyclique ainsi que la séquence sont essentiels dans l'activité. Afin de déterminer l'impact des chaînes latérales de chaque acide aminé des peptides, des mutations en alanine (dans la zone du hot spot) sont réalisées. Ces dérivés sont testés à 1,5 et 15  $\mu M$  en utilisant le même test que précédemment. D'après ces résultats (Fig. 126), on voit que la diminution la plus significative de l' $IC_{50}$  est obtenue lorsque la phénylalanine et la glycine sont remplacées et à un degré moindre la tyrosine et l'isoleucine. Les substitutions sur les autres acides aminés ont moins d'incidence sur l'inhibition. En accord avec la découverte du hot spot de la sous unité CK2 $\beta$ , ces résultats suggèrent que la séquence -YGF- est la partie fondamentale du peptide qui lui assure une activité biologique.



**Figure 126** : Peptides générés par alanine scanning testés comme inhibiteur de la formation du complexe CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$ .

L'objectif étant de découvrir d'autres peptides capables de reconnaître CK2 $\alpha$  de manière plus affine, nous devons tenir compte des caractéristiques du peptide Pc qui servira de modèle. Les distances entre les acides aminés essentiels et leur orientation seront prises en compte dans l'élaboration de la bibliothèque.

#### 5.4. Notre projet : découverte de nouveaux ligands par chimie combinatoire

Lors de ce travail, nous avons décidé de nous baser sur l'architecture du peptide à 15 acides aminés pour élaborer notre bibliothèque. Nous avons conservé la zone cruciale -YGF- et fait varier 3 positions de part et d'autre de cette région pour explorer les zones périphériques. Les 6 acides aminés restant sont conservés car ils ne semblent pas être impliqués dans le phénomène de reconnaissance.

La synthèse se déroule de la même manière que L1, cependant ici, la cyclisation n'est pas favorisée par des coudes présents au sein de la séquence. En effet, on suppose que la longueur et donc la flexibilité du peptide linéaire permettront à celui-ci de cycliser sur la résine à un faible taux de chargement. Dans un premier temps, pour étudier cette réaction de cyclisation, nous avons préparé le peptide modèle sur support solide selon la méthode de SPPS classique. Ce peptide immobilisé fournira un excellent moyen de mettre au point les conditions de criblage.

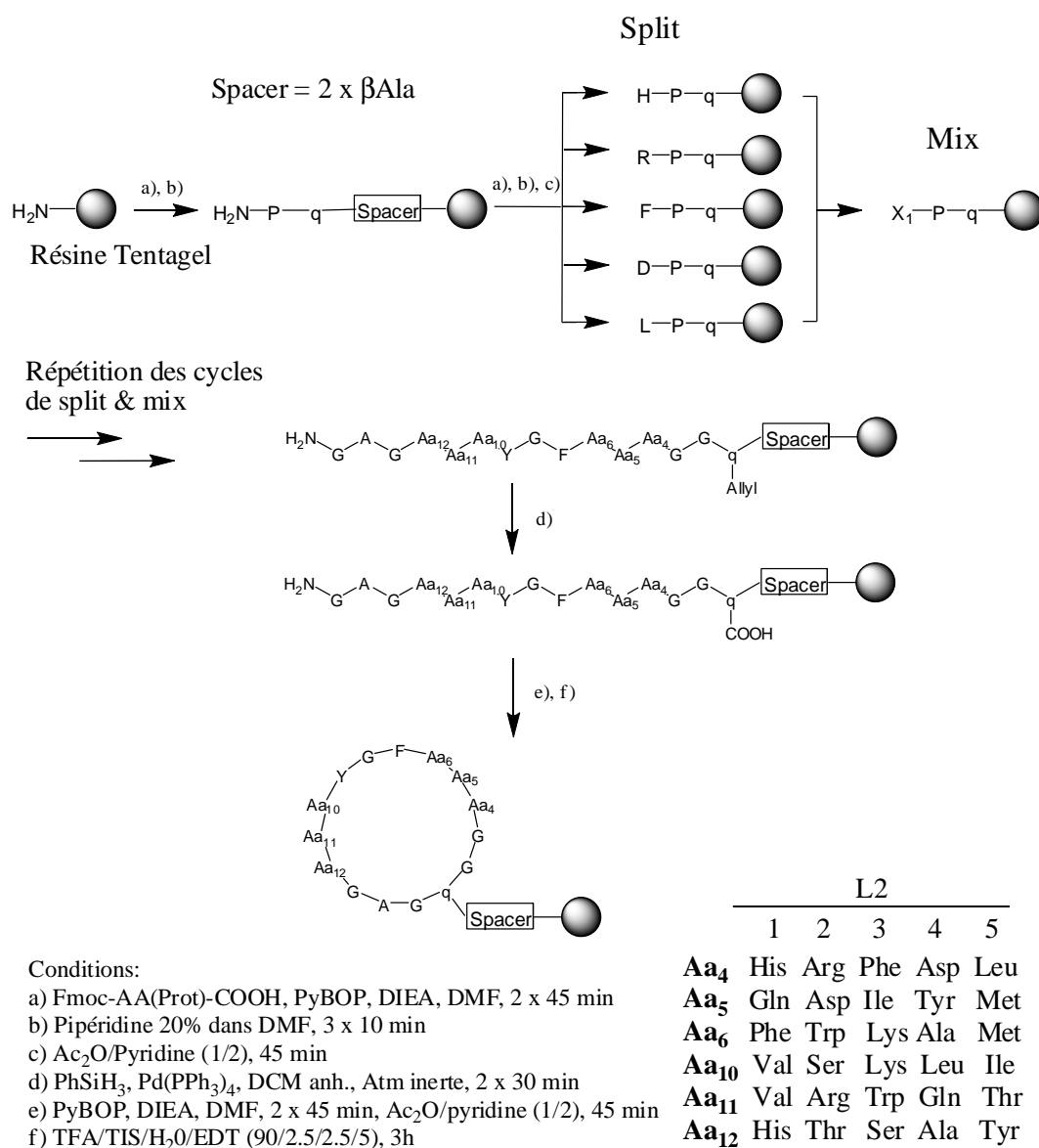


Schéma 16 : Synthèse de L2.

Cette réaction de cyclisation ne posant apparemment aucun problème, nous avons entrepris la synthèse de la bibliothèque L2. Elle se déroule en 6 splits de 5 acides aminés chacun, ce qui



nous donne 15625 séquences possibles (Schéma 16). Les tests colorimétriques du TNBS et Kaiser nous permettent de conclure que la cyclisation est complète après deux cycles de 45 minutes.

Il faut noter que L2 a été conçu afin de contenir le peptide original à 15 acides aminés. Cela nous permettra d'avoir un contrôle positif interne.

### 5.5 Tests biologiques :

Dans un premier temps, le peptide modèle immobilisé est soumis à un test d'activité kinase afin de vérifier que la présence du support n'a pas d'incidence sur la reconnaissance avec la sous-unité CK2 $\alpha$  lors du criblage. Cette expérience a été mise au point par Béatrice Laudet. Le principe de ce test repose sur le dosage de l'activité kinase de la protéine CK2 $\alpha$ <sup>197</sup>. Si le peptide immobilisé est en interaction avec la sous-unité CK2 $\alpha$ , alors sa quantité sera plus faible dans le surnageant et l'activité kinase qui en résulte également. Après incubation des billes avec la protéine et centrifugation, la radioactivité de la solution surnageante est mesurée et permet de confirmer l'interaction. Ce test s'étant révélé efficace pour évaluer la présence de peptides actifs sur un support solide, nous l'avons utilisé sur la librairie L2. Cette expérience a permis de confirmer que notre librairie contient des séquences actives.

Par manque de temps, nous n'avons malheureusement pas encore pu réaliser le criblage qui permettra de déterminer les séquences actives. Le test envisagé consistera à incuber un échantillon (80 mg de billes) représentatif de tous les peptides présents de la bibliothèque en présence de CK2 $\alpha$  marquée par un fluorophore. Les billes portant les peptides actifs en interaction avec la protéine seront visualisées par microscopie puis collectées pour l'analyse. La synthèse des peptides identifiés permettra ensuite de réaliser l'étude biologique.

---

<sup>197</sup> O. Filhol, C. Cochet, P. Wedegaertner, G. N. Gill, E. M. Chambaz. « Coexpression of Both Alpha and Beta. Subunits is Required for Assembly of Regulated Casein Kinase II. » *Biochemistry* **1991**, 30, 11133-11140.

---

# *Conclusion*

---



## **Conclusion**

---

L'objectif de ce travail de thèse était d'explorer de nouvelles approches combinatoires qui permettent de découvrir de nouvelles molécules biologiquement actives à base de peptides cycliques. Nous avons choisis d'étudier deux modèles de bibliothèques de produits différentes, l'un en solution et l'autre sur support solide, puis d'évaluer les propriétés de reconnaissance de ces composés envers plusieurs cibles biologiques.

Le premier type de librairie a été réalisé grâce à une nouvelle méthode de chimie combinatoire en solution que nous avons mise au point au cours de ce travail. Cette méthode est basée sur l'assemblage chimiosélectif de ligands de type oligosaccharide et/ou peptide sur le cyclodécapeptide RAFT par ligation oxime. Comme l'ont clairement montré les nombreuses études réalisées ces dernières années au laboratoire, le châssis moléculaire RAFT constitue en effet un excellent outil permettant de combiner diverses propriétés biologiques. Nous nous sommes appuyés sur ces travaux pour imaginer une stratégie combinatoire qui permette d'assembler sur le RAFT, non plus plusieurs copies de ligands identiques mais, de différente nature pour former des librairies appelées hétéroglycoclusters dans ce manuscrit. Les composés obtenus sous la forme de mélange vont se différencier par leur composition et leur organisation sur le RAFT. Dans un premier temps, ce travail nous a amené à synthétiser les différents partenaires mis en jeu lors de cet assemblage chimiosélectif. Le RAFT fonctionnalisé par des aldéhydes et des sucres oxyaminés en position anomère ont été préparés selon les protocoles de synthèse en solution et sur support développés au laboratoire. Cependant, nous avons observé la formation inattendue et majoritaire de l'anomère alpha en série fucose. Nous avons alors étudié cette réaction en faisant varier les conditions opératoires (sacre donneur, solvant) lors de la glycosylation. Nous avons ainsi montré l'influence de la nature du solvant, conduisant notamment préférentiellement à l'anomère alpha dans l'acétonitrile et l'anomère beta dans le THF. En parallèle, nous avons synthétisé des peptides ou des acides aminés portant une fonction oxyamine. La méthode classique utilisant une protection mono-Boc sur l'oxyamine présente malheureusement l'inconvénient de générer des produits parasites issus d'une réaction de bis-acylation. Pour éviter cette réaction secondaire, nous nous sommes intéressés à développer un nouveau groupe protecteur éthoxyéthylidène pour ces fonctions. Une étude complète réalisée sur des peptides linéaires, branchés et

cycliques a permis de confirmer que ce groupe protecteur assure une protection complète de l'oxyamine lors de la réaction d'acylation. Une fois les différents partenaires synthétisés, nous avons tout d'abord défini les conditions opératoires optimales (stoechiométrie, solvant) permettant de former nos librairies en utilisant des peptides modèles. Nous avons également développé une méthode de purification des excès de ligands oxyamine en utilisant un support fonctionnalisé par des aldéhydes. Cette stratégie a permis de purifier de manière rapide et très efficace nos bibliothèques sans biaiser leur composition. L'assemblage des oligosaccharides et des acides aminés a enfin été réalisé sur le RAFT pour former des bibliothèques et des sous bibliothèques composées de mélanges allant jusqu'à 136 hétéroglycoclusters. Pour valider l'intérêt de l'approche, nous avons finalement testés la reconnaissance de nos bibliothèques avec une protéine modèle : la Concanavalline A. Pour cela, nous avons mis au point une méthode de criblage par colonne d'affinité qui permet de s'affranchir des différences de concentrations relatives des composés de nos bibliothèques. L'analyse du criblage est basée sur la différence entre les profils CLHP avant et après passage sur la colonne. Parmi les différentes combinaisons testées, nous avons montré que les molécules associant la tyrosine au mannose présentent les meilleurs résultats, conformément aux études décrites dans la littérature. Les études SPR des composés isolés du mélange RAFT(Man)(Tyr) ont confirmé les résultats obtenus lors des colonnes d'affinité. Nous avons ainsi montré que le RAFT(Man)<sub>3</sub>(Tyr)<sub>1</sub> a un  $K_D$  du même ordre de grandeur que le RAFT(Man)<sub>4</sub>.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons utilisé la méthode de split and mix pour préparer des bibliothèques de peptides cycliques de différentes tailles sur support solide. Les bibliothèques créées sont encodées selon la méthode mise au point dans le laboratoire du Pr. J.-L. Reymond à Berne, méthode basée sur l'utilisation de paires uniques d'acides aminés lors de la synthèse. La première bibliothèque de cyclodécapeptide, basée sur le design des RAFT, a permis de valider la stratégie de synthèse et l'utilisation d'un acide aminé (D-Glu) modifié comme point d'ancrage sur le support. Cette bibliothèque a ensuite été criblée sur la vitamine B<sub>12</sub> (aquo- et cyano-cobalamine) puis décodée en collaboration avec l'équipe du Pr. J.-L. Reymond. Ceci a permis de découvrir plusieurs séquences actives. Les peptides sélectionnés ont été resynthétisés puis la titration spectrophotométrie de l'aquocobalamine réalisée au laboratoire a permis de mesurer la constante d'association de ces peptides de l'ordre de 10<sup>6</sup> M. Des études structurales par RMN devraient permettre d'élucider le mode d'interaction des peptides qui semble différent selon la présence d'une cystéine ou d'une histidine la séquence. De plus, une seconde bibliothèque de peptides cycliques de 15 acides aminés a été réalisée en

collaboration avec l'équipe du Pr. C. Cocher au CEA de Grenoble dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs de l'interaction protéine-protéine entre les deux sous-unités de la protéine kinase CK2. Le design de cette bibliothèque s'est appuyé sur des études antérieures concernant cette kinase. Les premiers tests biologiques se sont montrés prometteurs et une seconde série de tests devra permettre d'isoler les billes actives et ainsi déterminer la séquence des peptides actifs.

Ce travail de thèse portait essentiellement sur le développement de méthodes de synthèse et de criblage de bibliothèques combinatoires. L'efficacité et la complémentarité des deux approches proposées permettent d'envisager de nombreuses applications dans le domaine des interactions sucre/protéine ou protéine/protéine. Il s'agira par exemple d'exploiter la méthode d'assemblage en solution pour la préparation de vaccins synthétiques multiépitopiques ou la découverte d'inhibiteurs affins et sélectifs de protéines d'adhésion pathogènes telles que les lectines de *Pseudomonas aeruginosa* PA-IL et PA-IIL. L'étude portant sur la kinase CK2, et plus généralement sur des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire sera poursuivie selon l'approche supportée afin de découvrir ou d'améliorer l'efficacité d'inhibiteurs.



---

*Partie expérimentale*

---





## Partie Expérimentale

---

### 1. Matériel utilisé :

- **Réactifs et solvants :**

Tous les composés chimiques et les solvants commerciaux utilisés pour la synthèse des sucres proviennent de Fluka, Sigma Aldrich ou Acros Organics. Ils sont de qualité analytique et ont été utilisés directement sans purification. Les acides aminés protégés sont fournis par France-Biochem (Mendor, France), BACHEM-Biochimie SARL (Voisins-Le-Bretonneux, France), Advanced ChemTech ou Calbiochem-Novabiochem. Le réactif de couplage PyBOP<sup>®</sup> est fourni par Calbiochem-Novabiochem. Les résines Rink- Amide MBHA<sup>®</sup> et Sieber Amide<sup>®</sup> sont fournies par Calbiochem-Novabiochem, la résine Fmoc-Gly-Sasrin<sup>®</sup> par BACHEM (Voisins-Le-Bretonneux, F) et la résine chlorure de 2- chlorotrityle<sup>®</sup> par Advanced ChemTech.

- **Chromatographie :**

La purification des sucres a été effectuée par chromatographie sur colonne de gel de silice KIESELGEL 60 (0.063-0.200 mm, MERCK). Leur pureté et le suivi des réactions ont été vérifiés par chromatographie sur couche mince (gel de silice 60 F254 MERCK). D'une manière générale, les sucres ne possédant pas de groupe UV actif ont été révélés après avoir trempé la plaque CCM dans une solution aqueuse d'acide sulfurique (15%) composée de sulfate du cérium (1%) et de dimolybdate d'ammonium (2%) puis chauffage à 300°C. Les sucres oxyamines sont quant à eux révélés après trempage de la plaque CCM dans une solution d'éthanol contenant de la ninhydrine (1%), puis chauffage à 60°C. Pour les peptides et les glycopeptides, les chromatographies CLHP analytiques ont été réalisées en utilisant un équipement Waters comportant une pompe Waters 600, un système de contrôle Waters 600E, un détecteur UV Waters 2487 dual  $\lambda$ , et un intégrateur 746. Les CLHP semi-préparative ont été effectuées sur un équipement Waters avec deux prepLC Universal Base (et une Waters prepLC Chamber Assembly). Les colonnes sont éluées avec des gradients linéaires de solvants A (0.09% TFA dans H<sub>2</sub>O) et B (0.09% TFA dans MeCN:H<sub>2</sub>O 9:1) avec des débits de 1.3 mL/min en analytique et 22 mL/min en semi-préparative. L'eau de qualité Milli-Q est obtenue par filtration d'eau distillée sur un système de cartouche Milli-Q<sup>®</sup>, l'acétonitrile et

l'acide trifluoroacétique pour CLHP analytiques et semi-préparatives sont fournis respectivement par Carlo-Erba et par SdS (Peypin, France).

- **Spectrométrie RMN :**

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur les spectromètres BRUCKER, AM300 et U+ 500 Varian. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en ppm par rapport à un pic de solvant pris comme référence interne ( $\text{CDCl}_3$  : 7.24 ppm,  $\text{D}_2\text{O}$  : 4.79 ppm). Les spectres sont décrits avec les abréviations : s = singulet ; d = doublet ; dd = doublet dédoublé ; t = triplet ; td = triplet dédoublé ; q = quadruplet ; m = multiplet ; Car. = carbone aromatique ;  $\text{H}_{\text{ar}}$ . proton aromatique. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz (Hz).

- **Spectrométrie de masse :**

Les spectres de masse (SM) basse résolution ESI (Ionisation par ElectroSpray) ont été enregistrés sur le spectromètre VG Platform II (Micromass) équipé d'une source d'ionisation électrospray en mode positif, au Département de Chimie Moléculaire de Grenoble. Les spectres de masse basse résolution DCI (Ionisation par Désorption Chimique) ont été réalisés sur un spectromètre de masse de type Trappe à Ions Thermofinnigan Polaris Q en introduction directe grâce à une canne DEP (Direct Exposure Probe) au Service de Spectrométrie de Masse du Département de Chimie Moléculaire. Les spectres de masse MALDI ont été enregistrés en mode positif (matrice DHB), sur le spectromètre Autoflex de Bruker au Service de Spectrométrie de Masse du CERMAV/CNRS-Grenoble dirigé par C. Bosso.

- **Points de fusion :**

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide de l'appareil Electrothermal IA9100.

- **Pouvoir rotatoire :**

Les pouvoirs rotatoires ( $[\alpha]_{\text{D}}$ ) ont été mesurés à sur un polarimètre Perkin Elmer 341 à une température de 20°C.

- **Synthétiseur automatique de peptides :**

L'assemblage automatisé des peptides linéaires protégés a été réalisé à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides Advanced ChemTech 348  $\Omega$  et Applied Biosystems 433A.

- **Spectrométrie UV :**

Les spectres UV ont été effectués sur un appareil Cary 400 scan de chez Varian<sup>®</sup> en utilisant des cuvettes en quartz avec septum de 1,3 mL, 10mm de chez Hellma<sup>®</sup>. Les solutions sont introduites à l'intérieur des cuvettes à l'aide de micro-seringues Hamilton.

## **2. Protocole standard pour la synthèse des peptides :**

- **Synthèse de peptides linéaires protégés par SPPS :**

Les peptides linéaires protégés ont été assemblés manuellement ou de manière automatisée à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides Advanced ChemTech 348  $\Omega$  ou Applied Biosystems 433A (Plateau synthèse plate forme NANO BIO). Ces synthèses ont été réalisées selon les protocoles de SPPS en stratégie Fmoc/tBu. Les étapes de synthèse sur support solide sont réalisées dans un réacteur en verre en forme de poire comportant un filtre en verre fritté scellé à sa base. Ce fritté permet l'élimination des solvants et des excès de réactifs sous air comprimé. Avant utilisation, ce réacteur est silanisé pendant 12 heures avec une solution de  $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$  pure puis lavé plusieurs fois avec du dichlorométhane jusqu'à disparition de la moindre trace d'acide. En début de synthèse et après chaque lavage à l'éther, la résine est lavée et gonflée dans le réacteur en utilisant du DCM ( $2 \times 20 \text{ mL/g} \times 15 \text{ min.}$ ) puis du DMF ( $1 \times 20 \text{ mL/g} \times 15 \text{ min.}$ ).

- **Couplage des acides aminés protégés Fmoc-N- $\alpha$  :**

- ✓ **couplage manuel Protocole A-1 :**

Les réactions de couplage sont réalisées en utilisant, par rapport au taux de substitution de la résine, 1,5-2 éq. d'acides aminés protégés Fmoc-N- $\alpha$ , 1,5-2 éq. de PyBOP comme réactif de couplage et 3-4 éq. de DIEA comme base, dans du DMF préalablement dégazé durant 30 minutes. La résine est ensuite lavée avec du DMF ( $2 \times 20 \text{ mL/g} \times 1 \text{ min.}$ ) puis du DCM ( $2 \times 20 \text{ mL/g} \times 1 \text{ min.}$ ).

- ✓ **couplage automatique Protocole A-2 :**

Le robot est programmé pour réaliser les réactions de couplage en utilisant, par rapport au taux de substitution de la résine, 4 éq. d'acides aminés protégés Fmoc-N- $\alpha$ , 4 éq. de PyBOP comme réactif de couplage et 6 à 8 éq. de DIEA comme base, dans du DMF préalablement dégazé durant 30 minutes. La résine est ensuite lavée avec du DMF ( $2 \times 20 \text{ mL/g} \times 1 \text{ min.}$ ) puis du DCM ( $2 \times 20 \text{ mL/g} \times 1 \text{ min.}$ ).

- **Coupage des groupements protecteurs Fmoc-N- $\alpha$  sur support solide : Protocole B**

La résine est traitée avec une solution de pipéridine/DMF, 1/4 (20 mL/g x 3 x 10 min.) puis lavée avec du DMF (5 x 20 mL/g x 1 min.). Ce protocole est identique en synthèse manuelle et automatique. La quantité de groupements Fmoc clivés peut être déterminée par spectrométrie U.V. En effet, le dibenzofluvène produit par la coupure de Fmoc forme un adduit avec la pipéridine dont le coefficient d'extinction molaire à 299 nm est  $\epsilon_{299} 7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Les solutions de coupure et de lavage sont réunies et leur volume complété à une valeur connue V avec du MeOH. L'absorbance U.V à 299 nm de cette solution ( $A_{299}$ ) permet de déterminer la quantité de groupements Fmoc coupés (nFmoc) par l'intermédiaire de la loi de Lambert-Beer :  $n\text{Fmoc} = A_{299} \cdot V / \epsilon_{299} \cdot l$ , où l est la longueur du chemin optique. Cette mesure est communément utilisée pour suivre l'évolution d'une synthèse peptidique sur support solide et évaluer de manière indirecte le taux de substitution de la résine.

- **Suivi de la réaction :**

Le test de Kaiser et/ou le test TNBS permettent de vérifier si la réaction de couplage est complète.

Le test de Kaiser requiert :

- une solution de ninhydrine (500 mg) dans 10 mL de EtOH.
- une solution de phénol (80 g) dans 20 mL de EtOH.
- une solution de 2 mL de KCN 1nM diluée à 100 mL avec de la pyridine.

Trois gouttes de chacune de ces solutions sont ajoutées dans un tube à calciner contenant quelques grains de résine à analyser. Le tube est porté à 80-110°C pendant 3 min. la présence de fonctions amines libres se traduit par une couleur bleue pour les grains de résine (test de Kaiser positif). La réaction de couplage doit être répétée jusqu'à ce que les grains restent incolores (test de Kaiser négatif).

Le test TNBS requiert :

- une solution d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) environ 1% dans le DMF.
- une solution DIEA:DMF 1:9.

Six gouttes de chaque solution sont ajoutées dans un tube à calciner contenant quelques grains de résine à analyser. Le tube est laissé à température ambiante pendant 1 min.

La présence de fonctions amines libres se traduit par une couleur rouge-orange vive des grains de résine (test TNBS positif). La réaction de couplage doit être répétée jusqu'à ce que les grains restent incolores (test TNBS négatif).

- **Préparation d'échantillon pour analyse par CLHP :**

Après certaines étapes de couplage, quelques billes de résine sont prélevées pour analyser le produit obtenu. Elles sont traitées selon la procédure I, puis la solution est filtrée, le filtrat est évaporé sous vide et le résidu repris avec quelques gouttes du solvant CLHP A ou B. Le produit est ensuite analysé par chromatographie liquide haute performance.

- **Cyclisation des peptides en solution : Protocole C :**

Le peptide linéaire protégé est dissous dans du DMF ou du dichlorométhane (0.5 mmol/L) puis du PyBOP (1.1 éq.) et de la DIEA (4-5 éq.) sont ajoutés (pH 8-9). La réaction est placée sous agitation à température ambiante pendant 1 heure puis le solvant est évaporé sous vide et le peptide cyclique précipité dans l'éther. Il est généralement utilisé sans autre purification.

- **Coupage des groupements protecteurs N-ε :**

- ✓ **N-ε Boc en solution : Protocole D :**

Le peptide est dissous dans un mélange dichlorométhane:acide trifluoroacétique 1:1 et laissé sous agitation pendant 1 heure. La solution est évaporée sous pression réduite et le résidu précipité dans un mélange dichlorométhane/éther. Si un groupement -OtBu doit également être éliminé, on procède de la même manière avec une solution dichlorométhane:acide trifluoroacétique 1:4.

- ✓ **N-ε Aloc sur support solide : Protocole E :**

La résine est lavée avec du DCM ( $2 \times 20\text{mL/g} \times 10\text{ min.}$ ). Le cycle de coupure consiste à traiter la résine avec du  $\text{PhSiH}_3$  (25 éq.) dans 5mL de DCM anhydre pendant 3 minutes sous argon, puis d'ajouter le catalyseur  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,2 éq.) et de laisser sous agitation pendant 20 minutes. La résine est lavée par 10 ml de DCM, 10 mL de dioxane:H<sub>2</sub>O (9:1), 10 mL de DMF et  $2 \times 10\text{ mL}$  de DCM. Le cycle de coupure est ainsi effectué deux fois de suite.

- ✓ **N-ε Aloc en solution : Protocole F :**

Le peptide est traité avec du  $\text{PhSiH}_3$  (25éq.) dans 5 mL de DCM pendant 3 minutes sous argon, puis le catalyseur  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,2éq.) est ajouté. Après 30 minutes de réaction, le

mélange est concentré puis le résidu précipité plusieurs fois avec de l'éther. Le peptide est finalement repris dans un mélange de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 1:1 puis la solution est filtrée et lyophilisée.

- **Coupage de la résine : Protocole G :**

La résine est lavée avec du DCM (3 × 20 mL/g × 1 min.) puis séchée sous air comprimé. Elle est ensuite traitée de manière répétée avec :

- une solution TFA:DCM 1:99 (10 mL/g × 2 min.) pour la résine Sasrin<sup>®</sup>
- une solution AcOH:TFE:DCM 1:1:8 pendant 2 heures pour la résine Chlorotrityle<sup>®</sup>
- une solution TFA:TIS:H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 pour la résine Rink Amide MBHA<sup>®</sup> pendant 2 heures.
- une solution TFA :DCM 1 :99 et 10 cycles de 10 minutes pour la résine Sieber Amide<sup>®</sup>.

Après concentration des solutions de coupure, le peptide linéaire brut est obtenu par précipitation dans Et<sub>2</sub>O et lavé trois fois par de l'éther. Le produit est isolé soit par filtration, soit par centrifugation, puis séché sous pression réduite. Le peptide protégé peut être purifié par CLHP semi-préparative.

- **Formation de ponts disulfure :**

- ✓ **En solution : Protocole H**

Dissoudre le peptide dans un mélange MeOH aqueux (50%) et acide acétique (1 :1) puis ajouter une solution d'acide chlorhydrique en raison de 0,1 mL/mg de peptide. Ensuite du diode est ajouté (10 éq.) et la réaction est laissée sous agitation vigoureuse pendant 30 minutes à température ambiante. Une solution d'acide ascorbique 1M est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à disparition de la couleur pourpre (devient jaunâtre). Le mélange est concentré sous pression réduite pour laisser 1/3 du volume initial puis purifié par CLHP semi-préparative.

- ✓ **Sur phase solide : Protocole I**

La résine est préalablement lavée à l'aide de DCM (2 x 20 mL/g x 1 min) et de DMF (2 x 20 mL/g x 1 min). On ajoute ensuite une solution de DMF (20 mL/g) contenant 8 éq. de I<sub>2</sub> et 10 éq. de DIEA. La résine est laissée sous agitation pendant une heure à température ambiante puis lavée de nombreuses fois à l'aide de DMF et de DCM jusqu'à disparition de la coloration

orangé du a l'iode.

- **Conjugaison chimiosélective RAFT/Sucre-peptide : Protocole J**

Le RAFT est dissous dans de l'eau (10 mg/mL) et une solution du sucre oxyamine (ou peptide) à 10 mg/mL dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile est ajoutée à la solution (3 éq./sites) en présence d'acide acétique (10% du volume final). La réaction est placée sous agitation à température ambiante pendant 1 à 2 heures.

- **Fonctionalisation des peptides avec Boc-Aoa et PyBOP and Eei-Aoa-OSu sur phase solide : Protocole K**

Une solution de 1 équivalent de Boc-Aoa-OH **11** ou 2 équivalents de Eei-Aoa-OH **13**, 1 équivalent de PyBOP (ou 2 équivalents selon les peptides) et 2 équivalents of DIEA (pH 8) dans du DMF anhydre est ajoutée sur la résine. Après 45 minutes d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée et la résine lavée avec du DMF (5 x 1 min) et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 1 min). La réaction de couplage est vérifiée par le test TNBS. Les peptides sont finalement obtenus après élimination de la résine et des groupes protecteurs à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5) pendant 2 heures. Après évaporation, les peptides sont précipités dans l'Et<sub>2</sub>O et analysés par CLHP analytique et spectrométrie de masse ESI.

- **Fonctionalisation des peptides avec Boc-Aoa-OSu and Eei-Aoa-OSu sur phase solide : Protocole L**

Une solution de 1 équivalent de Boc-Aoa-OSu **12** ou 2 équivalents de Eei-Aoa-OSu **14** et 1 équivalent de DIEA (pH 8) dans du DMF anhydre est ajoutée sur la résine. Après 45 minutes d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée et la résine lavée avec du DMF (5 x 1 min) et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 1 min). La réaction de couplage est vérifiée par le test TNBS. Si nécessaire le procédé est répété une fois. Les peptides sont finalement obtenus après élimination de la résine et des groupes protecteurs à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5) pendant 2 heures. Après évaporation, les peptides sont précipités dans l'Et<sub>2</sub>O et analysés par CLHP analytique et spectrométrie de masse ESI.

- **Fonctionalisation des peptides avec Boc-Aoa-OSu and Eei-Aoa-OSu en solution : protocole M**



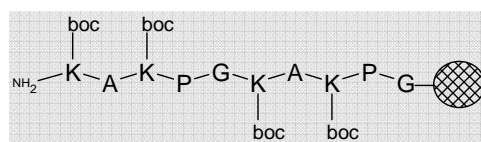
La fonctionnalisation est réalisée en utilisant 1 équivalent de Boc-Aoa-OSu **12** ou 2 équivalent de Eei-Aoa-OSu **14**, 1 équivalent of DIEA (pH 8) dans du DMF anhydre. La réaction est suivie par CLHP analytique. Après 45 minutes, la solution est évaporée et le peptide précipité dans Et<sub>2</sub>O. Les peptides sont finalement obtenus après élimination des groupes protecteurs à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5) pendant 2 heures. Après évaporation, les peptides sont précipités dans l'Et<sub>2</sub>O et analysés par CLHP analytique et spectrométrie de masse ESI.

### 3. Synthèses :

#### 3.1 Synthèses des peptides :

##### H<sub>2</sub>N-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Résine : 1

Le peptide **1** est assemblé selon le protocole de synthèse automatisée **A-1** sur 1 gramme de résine 2-chlorotriyle<sup>®</sup> (taux de substitution : 0.6

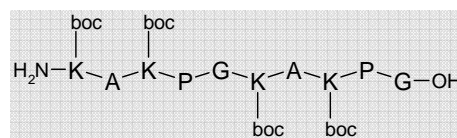


mmol/gramme). Le Fmoc terminal est éliminé selon la **procédure B**.

→ **Taux de conversion estimé** : 91%.

##### H<sub>2</sub>N-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-COOH : 2

Le peptide est décroché de la résine selon le **protocole I**. Le peptide linéaire **2** est obtenu sous la forme d'une



poudre blanche après précipitation dans l'éther (687 mg ; 0.50 mmol).

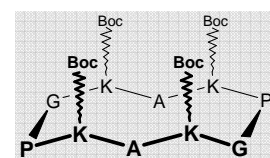
→ **Rendement** : 90% (estimé d'après le dernier loading obtenu).

→ **SM (ESI)** : C<sub>64</sub>H<sub>112</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub> (M<sub>calc</sub> = 1381.7) ; m/z : [M+H]<sup>+</sup> = 1381.7

→ **CLHP** : t<sub>r</sub> = 9.7 min (C<sub>18</sub>, 214 nm, 5-100% de B en 15 minutes)

##### c[Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly]: 3

La réaction de cyclisation est réalisée selon le **protocole C**. Le peptide cyclique **3** est récupéré après précipitation dans l'éther (677 mg ; 0.5 mmol).



→ **Rendement** : quantitatif.

→ **SM (ESI)** :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{64}H_{110}N_{14}O_{18}Na] = 1385.5$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 1385.7$

→ **CLHP** :  $t_R = 11.2$  min ( $C_{18}$ , 214 nm, 5-100% de B en 15 minutes)

#### c[Lys(*Boc-Ser-tBu*)-Ala-Lys(*Boc-Ser-tBu*)-Pro-Gly-Lys(*Boc-Ser-tBu*)-Ala-Lys(*Boc-Ser-tBu*)-Pro-Gly]: 4

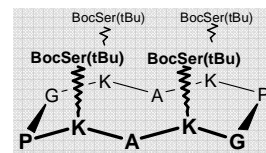
La réaction de déprotection des Boc en N-ε est réalisée sur le peptide **3** (0.073 mmol, 100 mg) est réalisée selon **protocole D**. Le peptide est récupéré après précipitation dans l'éther (0.060 mmol, 86mg).

→ **Rendement** : 83%.

→ **CLHP** :  $t_R = 11.7$  min ( $C_{18}$ , 214 et 250 nm, 5-100% B en 30min)

→ **SM (ESI)**:  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{64}H_{110}N_{14}O_{18}] = 963.2$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 963.3$

La réaction de couplage de la Boc-Ser(tBu) est réalisé selon **protocole A-1**. Le peptide **4** est récupéré après précipitation dans l'éther (115.5 ; 0.06 mmol).



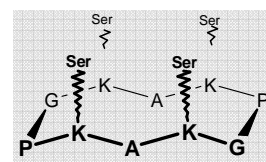
→ **Rendement** : Quantitatif.

→ **CLHP** :  $t_R = 13.9$  min ( $C_{18}$ , 214 et 250 nm, 5-100% B en 15min)

→ **SM (ESI)**:  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{92}H_{162}N_{18}O_{26}Na] = 1958.4$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 1958.0$

#### c[Lys(*Ser*)-Ala-Lys(*Ser*)-Pro-Gly-Lys(*Ser*)-Ala-Lys(*Ser*)-Pro-Gly] : 5

La réaction de déprotection des groupements Boc et -tBu est réalisée selon le **protocole D**. Le peptide **5** déprotégé est récupéré après précipitation dans l'éther (63 mg ; 0.048 mmol).



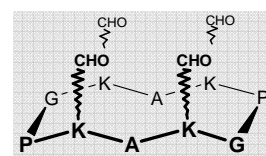
→ **Rendement** : 80%.

→ **CLHP** :  $t_R = 6.1$  min ( $C_{18}$ , 214 nm, 5-40% de B en 15 minutes).

→ **SM (ESI)**:  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{56}H_{98}N_{18}O_{18}] = 1311.5$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 1311.5$ .

#### c[Lys(*CHO*)-Ala-Lys(*CHO*)-Pro-Gly-Lys(*CHO*)-Ala-Lys(*CHO*)-Pro-Gly]: 6

Le RAFT **5** (33 mg ; 0.025 mmol) est dissous dans de l'eau pour atteindre une concentration de  $10^{-2}$  M (2 mL) et du périodate de sodium est ajouté (43 mg ; 20 éq./site). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant une heure maximum. Le peptide oxydé est purifié par CLHP



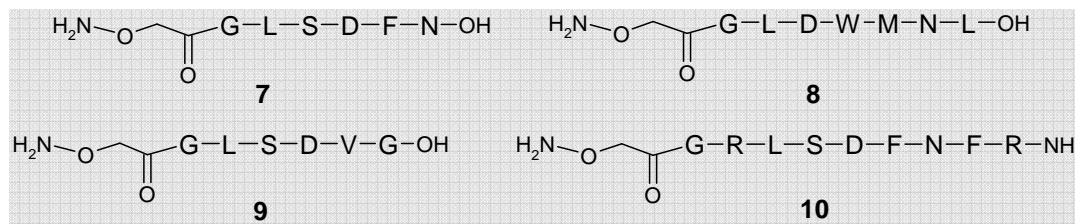
semi-préparative (gradient : 5-40% de B en 30 minutes) puis lyophilisé pour donner 25 mg du produit **6**.

→ **Rendement** : 60%.

→ **CLHP** :  $t_R = 6.2$  min ( $C_{18}$ , 214 nm, 5-40% de B en 15 minutes).

→ **SM (ESI)**:  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{52}H_{78}N_{14}O_{18}] = 1187.2$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 1187.2$

### Synthèse des peptides linéaires **7** à **10** :

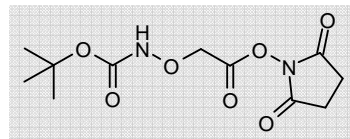


La synthèse des peptides linéaires **7** à **10** s'effectue selon le **protocole A1** sur 1 gramme de résine chlorotrytil<sup>®</sup> (taux de substitution 2,1 mmol/g) pour **7**, **8** et **9** et sur 1 gramme de Sieber Amide (taux de substitution 0,55 mmol/g) pour **10**. Le groupement Fmoc en N-terminale est éliminé selon le **protocole B**. La fonction oxyamine est incorporée selon le **protocole L**. Le peptide est ensuite décroché de la résine et les chaînes latérales des acides aminés sont déprotégées à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5) pendant 2 heures. Les solutions de lavages sont ensuite concentrées sous pression réduite puis les peptides sont précipités dans l'éther pour obtenir des poudres blanches. Les peptides sont enfin purifiés par CLHP semi-préparative et après lyophilisation ils sont obtenus sous la forme de poudres blanches.

Peptides	Rendement et quantité	CLHP ( $C_{18}$ , 214 et 250 nm, 5-60% de B en 15 min)	CLHP semi-preparative ( $C_{18}$ , 214 et 250 nm, 5-60% de B en 30 min)	SM (ESI)
<b>7</b>	58% (244 mg ; 0.336 mmol)	$t_R = 7.19$ minutes	14.6 minutes	$M_{\text{calc}}$ pour $[C_{30}H_{44}N_8O_{13}] = 725.73$ $M_{\text{trouvée}} = 725.1$
<b>8</b>	61% (338 mg ; 0.36 mmol)	$t_R = 11.58$ minutes	21.1 minutes	$M_{\text{calc}}$ pour $[C_{40}H_{61}N_{10}O_{13}S] = 921.05$ $M_{\text{trouvée}} = 921.3$
<b>9</b>	64% (236 mg ; 0.38 mmol)	$t_R = 5.95$ minutes	11.2 minutes	$M_{\text{calc}}$ pour $[C_{24}H_{41}N_7O_{12}] = 619.63$ $M_{\text{trouvée}} = 620.1$
<b>10</b>	65% (615 mg ; 0.52 mmol)	$t_R = 8.52$ minutes	15.65 minutes	$M_{\text{calc}}$ pour $[C_{51}H_{78}N_{18}O_{15}] = 1183.3$ $M_{\text{trouvée}} = 1183.5$

**L'ester du N'-Boc-aminooxyacetyl N-hydroxyOSuimide: 12**

A une solution d'acide du N-Boc-amino-oxyacétique **11** (0.500 g, 2.6 mmol) dans AcOEt/dioxane (1:1, 10 mL) à 0°C est ajouté du N-hydroxyOSuimide (0.310 g, 2.7 mmol) et du DCC (0.563



g, 2.7 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 heures puis filtré sur célite. Après évaporation du solvant, le résidu est dissous dans de l'AcOEt et lave avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau et une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous vide. Le solide obtenu est recristallisé dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ether/pentane afin d'obtenir une poudre blanche pure (0.618 g, 2.14 mmol).

→ **Rendement:** 83%.

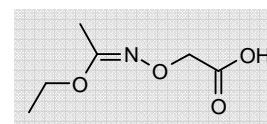
→ **SM (DCI):** M<sub>calc</sub> pour [C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>] = 306.1; M<sub>trouvée</sub> = 305.8

→ **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 7.66 (s, 1H, NH), 4.78 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 2.87 (s, 4H, CH<sub>2</sub>OSu), 1.49 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>).

→ **RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 171.8 (C=O), 171.1 (C=O), 168.7 (C=O<sub>OSu</sub>), 165.1 (C=O<sub>OSu</sub>), 70.9 (O-CH<sub>2</sub>-CO), 28.1 (CH<sub>3</sub>), 25.6 (CH<sub>3</sub>), 25.4 (CH<sub>3</sub>).

**N-(carboxymethyloxy)acetimidate : 13**

A une solution d'acide iodoacétique (5.00 g, 26.9 mmol) dans l'eau (10 mL) est ajouté une solution aqueuse de soude (1.6 ml, 40%) à 0°C. Après être revenue à température ambiante de l'ethyl N-



hydroxyacetimidate (4.16 g, 40.3 mmol) est ajouté suivi d'une solution aqueuse de soude (2.5 mL, 40%) et d'eau (10 mL) pour arriver à un pH basique (>12). Le mélange est agité 5 heures à 80°C puis refroidi à température ambiante. De l'eau est ensuite (50 mL) et la phase aqueuse est extraite successivement avec de l'Et<sub>2</sub>O et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase aqueuse est ramenée à pH 2-3 à l'aide d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique. La phase acidifiée est extraite avec de l'AcOEt et les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (50mL), séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le composé **13** est obtenu sous forme d'une huile incolore (2.99 g, 18.6 mmol).

→ **Rendement:** 69%.

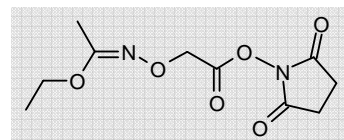
→ **SM (ESI):** M<sub>calc</sub> pour [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>] = 162.2 ; m/z : M<sub>trouvée</sub> = 162.0

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 4.48 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 4.00 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.27 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 174.5 (C=O), 70.2 (O-CH<sub>2</sub>-CO), 62.8 (CH<sub>2</sub>-O), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>).

### L'ester du N'-(carboxymethyloxy)acetimide N-hydroxyOSuimide: 14

L'ester activé **14** est obtenu en suivant le même protocole décrit pour **12**. Après filtration de la DCU et évaporation, le résidu est purifié par une chromatographie "flash" sur gel de silice (éluant:



AcOEt/hexane 1/1) et recristallisé dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/pentane afin d'obtenir le composé **14** sous forme de cristaux (3.3 g, 12.7 mmol).

→ Rendement : 68%.

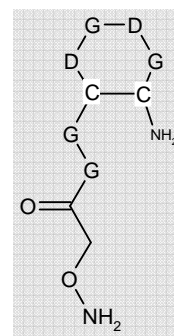
→ SM (DCI): M<sub>calc</sub> pour [C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>] = 259.1 ; M<sub>trouvée</sub> = 259.2

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 4.78 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 4.01 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 2.84 (s, 4H, CH<sub>2</sub>O<sub>Su</sub>) 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>) ;

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 168.8 (C=O), 165.7 (C=O<sub>OSu</sub>), 164.8 (C=O<sub>OSu</sub>), 68.5 (O-CH<sub>2</sub>-CO), 62.8 (CH<sub>2</sub>-O), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du peptide cyclique : 16''

Le peptide **16** est synthétisé sur 450 mg de résine Sieber amide<sup>®</sup> (taux de substitution 0,55mmol/g) selon le **protocole A2**. La suite de la synthèse peut se faire en solution ou sur support.



✓ En solution :

Après déprotection du groupement Fmoc selon le **protocole B** le peptide **16'** est libéré de la résine selon le **protocole G** puis précipité dans l'éther (100 mg ; 0.126 mmol). Le peptide est ensuite cyclisé en solution selon le **protocole H** et purifié par CLHP semi-préparative (5-60 % B en 30 minutes) (57mg ; 0.072 mmol).

→ Rendement : 57%.

→ CLHP : t<sub>R</sub> = 12.50 min (C<sub>18</sub>, 214 nm, 5-100% de B en 15 minutes).

→ SM (ESI): M<sub>calc</sub> pour [C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>] = 792.28 ; M<sub>trouvée</sub> = 792.30

Ensuite la fonction oxyamine est introduite selon le **protocole M**. Après concentration sous pression réduite le peptide est déprotégé à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O pendant 2 heures. Le produit **16''** est ensuite obtenu après purification par CLHP semi-préparative (5-40 % B en 30 minutes) (34 mg ; 0.045 mmol)

→ **Rendement** : 63%.

→ **CLHP** :  $t_R = 12.58$  min (C<sub>18</sub>, 214 nm, 0-30% de B en 30 minutes).

→ **SM (ESI)**:  $M_{\text{calc}}$  pour [C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>] = 752.74 ;  $M_{\text{trouvée}} = 753.0$

✓ Sur support :

Après déprotection du groupement Fmoc selon le **protocole B** le peptide **16** est cyclisé sur la résine selon le **protocole I**. La fonctionnalisation par oxyamine se déroule selon le **protocole L**. Le peptide **16''** est ensuite libéré de la résine et déprotégé à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O pendant 2 heures. Après précipitation dans l'éther, le composé est purifié par CLHP semi-préparative (0-30 % B en 30 minutes) (62 mg ; 0.082 mmol).

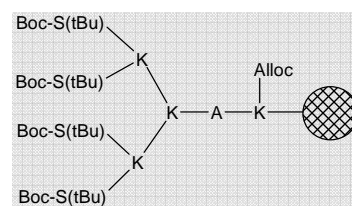
→ **Rendement** : 32% (obtenu à partir du dernier loading).

→ **CLHP** :  $t_R = 12.58$  min (C<sub>18</sub>, 214 nm, 0-30% de B en 30 minutes).

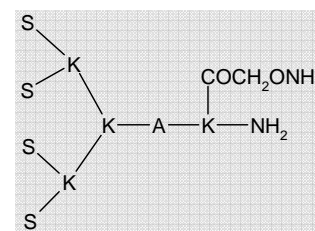
→ **SM (ESI)**:  $M_{\text{calc}}$  pour [C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>] = 752.74 ;  $M_{\text{trouvée}} = 753.1$

### Peptide MAP : 17 et 17'

Le peptide MAP **17** est synthétisé sur 450 mg de résine Rink Amide MBHA<sup>®</sup> (taux de substitution 0.69 mmol/g) selon le **protocole A2**. La déprotection du groupe Alloc est réalisée selon le **protocole E**. Puis la fonctionnalisation de la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine se déroule selon le **protocole L**.

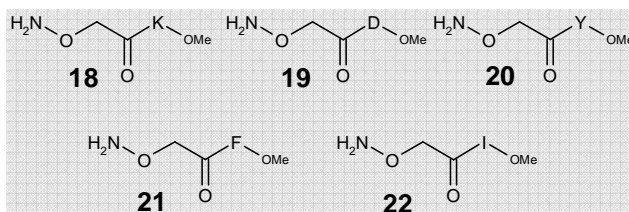


La résine est enfin éliminée et les groupes protecteurs enlevés à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5) pendant 2 heures. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite et précipitée et lavée plusieurs fois à l'éther pour obtenir le peptide **17'** sous forme de poudre blanche.



→ SM (ESI):  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{41}H_{80}N_{15}O_{15}] = 1022.59$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 1022.07$

### Acides aminés oxyamine :



La fonction oxyamine est incorporée selon le **protocole L** aux acides aminés. Après concentration sous pression réduite le résidu est purifié par CLHP semi-préparative puis lyophilisé. Ensuite un traitement avec une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O pendant 2 heures permet d'obtenir l'acide aminé déprotégé et fonctionnalisé par oxyamine.

AA- ONH <sub>2</sub>	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm)	SM (ESI)	
			M <sub>calc</sub> pour :	M <sub>trouvée</sub>
Lys-ONH <sub>2</sub> 18	53%	t <sub>R</sub> = 16.2 minutes (5-40% de B en 30 min)	[C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] M <sub>calc.</sub> = <b>234.14</b>	M <sub>trouvée</sub> = 234.67
Asp-ONH <sub>2</sub> 19	87%	t <sub>R</sub> = 14.5 minutes (5-40% de B en 30 min)	[C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ] M <sub>calc.</sub> = <b>221.07</b>	M <sub>trouvée</sub> = 221.19
Tyr-ONH <sub>2</sub> 20	50%	t <sub>R</sub> = 4.86 minutes (5-40% de B en 15 min)	[C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ] M <sub>calc.</sub> = <b>269.11</b>	M <sub>trouvée</sub> = 269.47
Phe-ONH <sub>2</sub> 21	70%	t <sub>R</sub> = 5.58 minutes (5-100% de B en 15 min)	[C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ] M <sub>calc.</sub> = <b>253.11</b>	M <sub>trouvée</sub> = 253.38
Ile-ONH <sub>2</sub> 22	41%	t <sub>R</sub> = 5.91 minutes (5-40% de B en 15 min)	[C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ] M <sub>calc.</sub> = <b>219.13</b>	M <sub>trouvée</sub> = 219.21

Rq: C\* correspond au carbone asymétrique de la molécule.

#### H-Aoa-Lys-OMe: 18

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 4.59 (t large, 1H, CH\*), 4.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-ONH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.96 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH\*), 1.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.43 (m, 2H, CH\*-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 174.3 (O=CNH), 170.1 (CO<sub>2</sub>), 72.3 (CH<sub>2</sub>-O), 53.4 (C\*), 52.7 (CH<sub>3</sub>), 49.6 (C-NH), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>).

#### H-Aoa-Asp-OMe: 19

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 4.85 (t, 1H, J<sub>CH\*,CH2</sub> = 6.3 Hz, CH\*), 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-ONH<sub>2</sub>), 3.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.95 (d, 2H, J<sub>CH2,CH\*</sub> = 6.3 Hz).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 174.1 (O=CNH), 172.8 (CO<sub>2</sub>-Me), 169.6 (CO<sub>2</sub>H), 71.9 (CH<sub>2</sub>-O), 53.8 (C\*), 49.1 (CH<sub>3</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>-C=O).

**H-Aoa-Tyr-OMe: 20**

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 7.10 (m, 2H, HAr.), 6.81 (2H, HAr.), 4.71 (m, 1H,  $\text{CH}^*$ ), 4.50 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-ONH}_2$ ), 3.70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.13 (dd, 1H,  $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{Har.}} = 5.7$  Hz,  $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 13.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{a}$ ), 2.94 (dd, 1H,  $J_{\text{CH}_2\text{b},\text{Har.}} = 8.7$  Hz,  $J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}_2\text{a}} = 13.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{b}$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 173.7 (C=O-NH), 169.5 ( $\text{CO}_2$ ), 154.9 ( $\text{C}_{\text{Ar.}}\text{-OH}$ ), 130.9 ( $\text{C}_{\text{Ar.}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Ar.}}\text{-CH}_2$ ), 115.8 ( $\text{C}_{\text{Ar.}}$ ), 72.1 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 54.4 ( $\text{C}^*$ ), 53.4 ( $\text{CH}_3$ ), 36.1 ( $\text{CH}_2\text{-Ph.}$ ).

**H-Aoa-Phe-OMe: 21**

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 7.28 (m, 5H, HAr.), 4.77 (dd, 1H,  $J_{\text{H}^*,\text{CH}_2\text{a}} = 6$  Hz,  $J_{\text{H}^*,\text{CH}_2\text{b}} = 9$  Hz,  $\text{CH}^*$ ), 4.41 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-ONH}_2$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.01 (dd, 1H,  $J_{\text{C}^*,\text{CH}_2\text{b}} = 9$  Hz,  $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 14.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{b}$ ), 3.22 (dd, 1H,  $J_{\text{C}^*,\text{CH}_2\text{a}} = 6$  Hz,  $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 14.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{a}$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 173.7 (O=C-NH), 170.1 ( $\text{CO}_2$ ), 136.8 – 127.5 ( $5\times\text{C}_{\text{Ar.}}$ ), 72.5 ( $\text{CH}_2\text{-ONH}_2$ ), 54.3 ( $\text{C}^*$ ), 53.5 ( $\text{CH}_3$ ), 36.9 ( $\text{CH}_2\text{-Ph.}$ ).

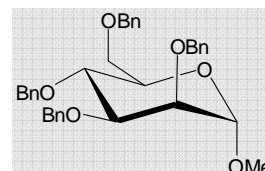
**H-Aoa-Ile-OMe: 22**

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 4.63 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-ONH}_2$ ), 4.42 (d, 2H,  $J_{\text{H}^*,\text{CH}} = 6$  Hz,  $\text{CH}^*$ ), 3.76 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 1.95 (m, 1H, CH), 1.41-1.22 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0.88 (m, 6H,  $2\times\text{CH}_3$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 174.2 ( $\text{CO}_2$ ), 170.0 (O=CNH), 72.0 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 57.7 ( $\text{C}^*$ ), 53.2 ( $\text{CH}_3$ ), 36.8 (CH), 25.2 ( $\text{CH}_2$ ), 15.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 10.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ).

**3.2 Synthèses des sucres :****2,3,4,6-Tétra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyrannoside de méthyle : 24**

Dans un bain de glace, de l'hydrure de sodium à 60% en dispersion dans une huile minérale (3.20 g ; 8 éq.) est ajouté en plusieurs portions à une solution d' $\alpha$ -D-mannopyrannoside de méthyle **23** (2.00 g ; 10.0 mmol) dans du DMF (100 mL). Après 1 heure d'agitation, du bromure de benzyle (9.8 mL ; 8 éq.) est ajouté et la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 1 nuit. Après addition de méthanol (20 mL), le mélange est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le résidu obtenu est finalement chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane) pour donner 5.23 g d'une huile correspondant au produit benzylé **24**.



→ Rendement : 92%.

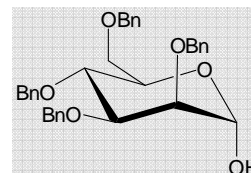
→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.32-7.07 (m, 20H, Har.), 4.82-4.42 (m, 8H,  $4\text{CH}_2$ ), 4.69 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1.7$  Hz, H-1), 3.90 (t, 1H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-4), 3.80 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3.0$  Hz, H-3), 3.72-3.69 (dd, 1H, H-2), 3.68-3.63 (m, 3H, H-5, H-6), 3.24 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).



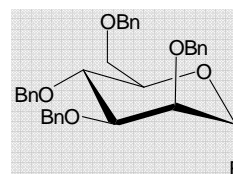
→ RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 139.0 (Car.), 138.9 (Car.), 138.8 (Car.), 138.8 (Car.), 128.8 (CHar.), 128.7 (CHar.), 128.7 (CHar.), 128.4 (CHar.), 128.2 (CHar.), 128.2 (CHar.), 128.0 (CHar.), 128.0 (CHar.), 127.9 (CHar.), 127.8 (CHar.), 99.4 (C-1), 80.7 (C-3), 75.5 ( $\text{CH}_2$ ), 75.4, 75.0 (C-2, C-4), 73.8 ( $\text{CH}_2$ ), 73.0 ( $\text{CH}_2$ ), 72.5 ( $\text{CH}_2$ ), 72.1 (C-5), 69.8 (C-6), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ).

### Fluorure de 2,3,4,6-Tétra-*O*-benzyl-D-mannopyrannosyle : 26

Le composé benzylé précédent **24** (5.23 g ; 9.4 mmol) est dissous dans une solution d'acide acétique et d'acide sulfurique 1M (4/1 ; 100 mL) est le mélange est chauffée à 90°C pendant 6 heures. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite puis reprise avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  et avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée pour obtenir 3.1 g du produit **25** sous la forme d'une huile utilisé directement pour la fluoration.



Sous un flux d'argon, le produit **25** (1.25 g ; 2.3 mmol) est dissous dans du THF (5 mL) et refroidi à -30°C. Du trifluorure de diéthylaminosulfure (367 mL ; 1.2 éq.) est alors ajouté puis le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30



minutes. Le mélange est à nouveau refroidit à -30°C, puis du méthanol (1 mL) est ajouté et la solution laissée quelques minutes à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris avec du dichlorométhane et lavé avec une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$ . La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée. Le résidu est enfin purifié sur colonne de gel de silice (éluant : hexane 9 / acétate d'éthyle 1) pour donner 1.2 g du produit fluoré **26**.

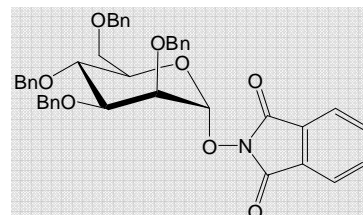
→ Rendement : 95%.

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.30-7.05 (m, 20H, Har.), 5.50 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 1.5$  Hz,  $J_{1,F} = 50.5$  Hz, H-1), 4.81-4.42 (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ), 3.99 (t large, 1H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-4), 3.86-3.76 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.70 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 4.4$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.0$  Hz, H-6a), 3.62 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 2.0$  Hz).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 138.7 (Car.), 138.6 (Car.), 138.6 (Car.), 138.3 (Car.), 128.9 (CHar.), 128.7 (CHar.), 128.4 (CHar.), 128.3 (CHar.), 128.2 (CHar.), 128.1 (CHar.), 128.0 (CHar.), 106.9 (d,  $J_{\text{C1,F}} = 223$  Hz, C-1), 105.4, 79.6, 75.6 ( $\text{CH}_2$ ), 74.7, 74.6, 74.5, 74.2, 73.9 ( $\text{CH}_2$ ), 73.8, 73.7 ( $\text{CH}_2$ ), 73.0 ( $\text{CH}_2$ ), 69.0 (C-6).

***O*-(2,3,4,6-Tétra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyrannosyl)-*N*-oxyphthalimide : 27**

A une solution composée du produit fluoré **26** (1.27 g ; 2.3 mmol), d'hydroxyphthalimide (0.38 g ; 1 éq.) et de triéthylamine (325 mL ; 1 éq.) dans du dichlorométhane (10 mL) est ajouté du  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (1.1 mL ; 4 éq.). Après une nuit, du dichlorométhane est alors ajouté puis la phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis de l'eau, séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : hexane 7 / acétate d'éthyle 3) pour donner 1.2 g du produit **27**.



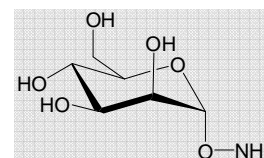
→ **Rendement** : 75%.

→ **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.74-7.63 (m, 4H, Har.<sub>Ph</sub>), 7.37-7.10 (m, 20H, Har.<sub>Bn</sub>), 5.48 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1.8$  Hz), 4.81-4.33 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 4.50 (m, 1H, H-5), 4.13-4.03 (m, 2H, H-2, H-4), 3.91 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3.2$  Hz,  $J_{3,4} = 8.9$  Hz, H-3), 3.81 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 3.7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.2$  Hz, H-6a), 3.61 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 1.9$  Hz, H-6b).

→ **RMN  $^{13}\text{C}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 163.6 (C=O), 138.9 (Car.<sub>Bn</sub>), 138.8 (Car.<sub>Bn</sub>), 138.7 (Car.<sub>Bn</sub>), 138.2 (Car.<sub>Bn</sub>), 134.9 (CHar.<sub>Ph</sub>), 128.8 (Car.<sub>Ph</sub>), 128.7 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.7 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.6 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.5 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.3 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.2 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.0 (CHar.<sub>Bn</sub>), 128.0 (CHar.<sub>Bn</sub>), 127.9 (CHar.<sub>Bn</sub>), 127.8 (CHar.<sub>Bn</sub>), 123.9 (CHar.<sub>Ph</sub>), 104.1 (C-1), 79.7 (C-3), 75.3 (CH<sub>2</sub>), 74.6, 74.1, 73.6 (CH<sub>2</sub>), 73.5, 73.3 (CH<sub>2</sub>), 72.7 (CH<sub>2</sub>), 69.0 (C-6).

***O*- $\alpha$ -D-mannopyrannosyl-oxyamine : 29**

Sous atmosphère d'hydrogène, un mélange contenant le composé **27** (0.23 g ; 0.3 mmol) et du Pd/C 10% (13 mg ; 0.4 éq.) dans une solution méthanol 1 / dichlorométhane 1 (5 mL) est placé sous agitation



pendant 3 heures. Le mélange est filtré sur célite et le filtrat évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris avec de l'eau et la phase aqueuse est lavée plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle puis lyophilisée. Le produit **28** obtenu est repris avec de l'éthanol à 95% puis on ajoute de la méthylhydrazine (160 mL ; 10 éq.) et la solution est placée sous agitation pendant 2 heures. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane 9 / éthanol 1 puis dichlorométhane 1 / éthanol 1). Le produit collecté est révélé sur CCM par de la ninhydrine. Après évaporation sous pression réduite et lyophilisation, on obtient 26 mg d'un lyophilisat blanc correspondant au produit **29**.

→ Rendement : 44%.

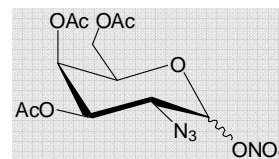
→ SM (ESI) :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NO}_6] = 196.08$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 195.94$

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 5.00 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1.7$  Hz, H-1), 4.03 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 2.8$  Hz, H-2), 3.97 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 1.3$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12.3$  Hz, H-6a), 3.88 (dd,  $J_{5,6b} = 3.7$  Hz, H-6b), 3.76-3.72 (m, 3H, H-3, H-4, H-5).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 97.6 (C-1), 73.4, 71.2, 69.4 (C-2), 67.2, 61.4 (C-6).

### Nitrate de 3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-azido-2-désoxy-D- galactopyrannosyle : 34

Au galactal triacétylé **33** (1.01 g ; 3.7 mmol) dissous dans de l'acétonitrile (20 mL) est ajouté un mélange de nitrate de cérium ammonium (6.04 g ; 3 équ.) et d'azote de sodium (0.72 g ; 3 équ.). Le



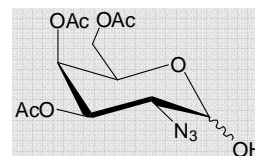
tout est placé sous agitation vigoureuse à  $-15^\circ\text{C}$  pendant environ 3 heures. Le mélange est ensuite repris à l'éther froid et lavé plusieurs fois avec de l'eau glacée. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis évaporée sous vide. Le sirop jaune-orangé **34** obtenu est alors purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : hexane 4 / acétate d'éthyle 1) pour finalement récupérer 1.06 g du mélange anomère avec un rapport  $\alpha / \beta$  d'environ 1 / 0.6.

→ Rendement : 83%

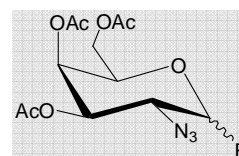
→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 6.31 (d,  $J_{1\alpha,2\alpha} = 4.1$  Hz, H-1 $\alpha$ ), 5.55 (d,  $J_{1\beta,2\beta} = 8.9$  Hz, H-1 $\beta$ ), 5.47 (dd,  $J_{4\alpha,5\alpha} = 1.4$  Hz,  $J_{3\alpha,4\alpha} = 3.4$  Hz, H-4 $\alpha$ ), 5.36 (d large,  $J_{3\beta,4\beta} = 3.4$  Hz, H-4 $\beta$ ), 5.22 (dd,  $J_{2\alpha,3\alpha} = 11.0$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 4.94 (dd,  $J_{2\beta,3\beta} = 10.3$  Hz, H-3 $\beta$ ), 4.34 (t large,  $J_{5\alpha,6\alpha} = 7.2$  Hz, H-5 $\alpha$ ), 4.16-4.03 (m, H-2 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha\alpha,\beta$ , H-6 $\beta\alpha,\beta$ ), 3.79 (dd, H-2 $\beta$ ), 2.17-1.97 (6s, 6OCOCH $_3$ ).

### Fluorure de 3,4,6- Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyrannosyl : 36

Une solution contenant le composé **34** (0.3 g ; 0.8 mmol) et du nitrite de sodium (0.11 g ; 2 équ.) dans un mélange dioxane 1 / eau 1 (5 mL) est placée sous agitation à  $80^\circ\text{C}$  pendant 6 heures. La solution est ensuite extraite par de l'acétate d'éthyle puis la phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée puis le produit **35** obtenu sous forme d'huile est utilisé directement lors de la fluoration.



On procède de la même manière que pour le produit **26**. On obtient 1.53 g d'une huile incolore correspondant au mélange d'anomère  $\alpha$  et  $\beta$  fluoré. Le produit **36** est récupéré sous la forme d'une huile incolore après purification sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane).



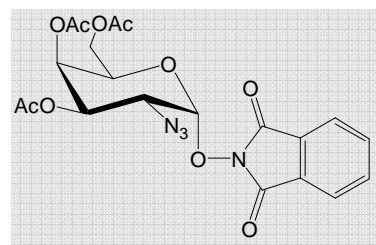
→ **Rendement** : quantitatif.

→ **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 5.71 (dd,  $J_{1\alpha,2\alpha} = 2.6$  Hz,  $J_{1\alpha,F} = 52.2$  Hz, H-1 $\alpha$ ), 5.48 (dd,  $J_{4\alpha,5\alpha} = 1.2$  Hz,  $J_{3\alpha,4\alpha} = 3.2$  Hz, H-4 $\alpha$ ), 5.36-5.34 (m, H-3 $\alpha$ ), 5.32 (td,  $J_{4\beta,5\beta} = 1.1$  Hz,  $J_{3\beta,4\beta} = 3.3$  Hz, H-4 $\beta$ ), 5.09 (dd,  $J_{1\beta,2\beta} = 7.5$  Hz,  $J_{1\beta,F} = 51.8$  Hz, H-1 $\beta$ ), 4.83 (ddd,  $J_{3\beta,F} = 0.8$  Hz,  $J_{2\beta,3\beta} = 10.9$  Hz, H-3 $\beta$ ), 4.36 (td,  $J_{5\alpha,6\alpha} = 6.4$  Hz, H-5 $\alpha$ ), 4.17-4.06 (m, H-6 $\alpha,\beta$ ), 3.96 (t large,  $J_{5\beta,6\beta} = 6.3$  Hz, H-5 $\beta$ ), 3.78 (ddd,  $J_{2\beta,F} = 12.7$  Hz, H-2 $\beta$ ), 3.78-3.68 (m, H-2 $\alpha$ ), 2.13-2.01 (6s, 6OCOCH<sub>3</sub>).

→ **RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 170.7 (C=O), 170.3 (C=O), 170.2 (C=O), 170.0 (C=O), 169.6 (C=O), 108.3 (d,  $J_{C-1\beta,F} = 217$  Hz, C-1 $\beta$ ), 106.2 (d,  $J_{C-1\alpha,F} = 224$  Hz, C-1 $\alpha$ ), 71.6 (C-5 $\beta$ ), 71.0 (d,  $J_{C-3\beta,F} = 11$  Hz, C-3 $\beta$ ), 69.5 (C-5 $\alpha$ ), 68.5 (C-3 $\alpha$ ), 67.2 (C-4 $\alpha$ ), 66.3 (C-4 $\beta$ ), 61.8 (C-6 $\alpha$ ), 61.5 (C-6 $\beta$ ), 61.2 (d,  $J_{C-2\beta,F} = 22$  Hz, C-2 $\beta$ ), 57.8 (d,  $J_{C-2\alpha,F} = 24$  Hz, C-2 $\alpha$ ), 21.0 (OCOCH<sub>3</sub>), 20.9 (OCOCH<sub>3</sub>), 20.8 (OCOCH<sub>3</sub>).

### ***O*-(3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-azido-2-désoxy-D- galactopyrannosyl)-*N*-oxyphthalimide : 37**

A partir du composé fluoré **36**, on procède de la même manière que pour le produit **27**. Le dérivé **37** est récupéré sous la forme de cristaux blancs après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane 9 / acétate d'éthyle 1) et recristallisation dans un mélange éther / pentane. Le composé **38** est obtenu sous forme d'huile incolore.



→ **Rendement** : 24%.

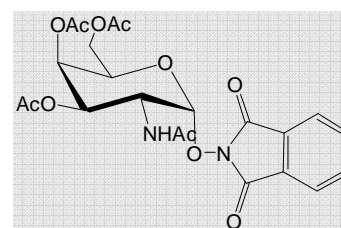
→ **Point de fusion** : 105-107°C.

→ **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 7.85-7.75 (m, 4H, Har.), 5.57 (d large, 2H,  $J_{1,2} = J_{3,4} = 3.4$  Hz, H-1, H-4), 5.47 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.3$  Hz, H-3), 5.17 (t large, 1H,  $J_{5,6} = 6.4$  Hz, H-5), 4.23 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11.3$  Hz, H-6a), 3.97-3.92 (m, 2H, H-2, H-6b), 2.14, 2.06, 2.02 (3s, 9H, 3OCOCH<sub>3</sub>).

→ **RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 170.8 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.3 (C=O<sub>Ac</sub>), 169.9 (C=O<sub>Ac</sub>), 163.3 (C=O<sub>Ph</sub>), 135.2 (CH<sub>ar</sub>), 129.1 (C<sub>ar</sub>), 124.2 (CH<sub>ar</sub>), 103.5 (C-1), 69.2 (C-5), 68.2 (C-4), 67.7 (C-3), 61.6 (C-6), 57.0 (C-2), 21.1 (OCOCH<sub>3</sub>).

### ***O*-(2-acétamido-3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-désoxy- $\alpha$ -D- galactopyrannosyl)-*N*-oxyphthalimide : 39**

Le produit **37** (0.68 g ; 1.43 mmol) est dissous dans un mélange MeOH 10 / Ac<sub>2</sub>O 1 (15 mL). On ajoute du Pd/C 10% (0.15 g) et on fait buller de l'hydrogène gazeux dans la solution pendant 2 minutes. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation, sous pression d'hydrogène, pendant une heure à température



ambiante. Le catalyseur est ensuite filtré sur célite et le mélange est évaporé puis recristallisé dans un mélange dichlorométhane / éther. On obtient 0.35 g du produit N-acétylé **39** sous la forme de cristaux blancs.

→ Rendement : 50%.

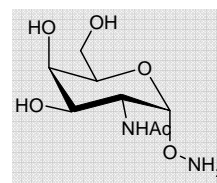
→ Point de fusion : 148-150°C.

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 7.86-7.77 (m, 4H, Har.), 6.07 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>2,NH</sub> = 9.6 Hz, NH), 5.54 (d, 1H, <sup>J</sup><sub>3,4</sub> = 3.0 Hz, H-4), 5.38 (d, 1H, <sup>J</sup><sub>1,2</sub> = 3.4 Hz, H-1), 5.34 (dd, 1H, <sup>J</sup><sub>2,3</sub> = 11.3 Hz, H-3), 5.08 (t large, 1H, <sup>J</sup><sub>5,6</sub> = 6.4 Hz, H-5), 4.80 (ddd, 1H, H-2), 4.30 (dd, 1H, <sup>J</sup><sub>6a,6b</sub> = 11.3 Hz, H-6a), 4.00 (dd, 1H, H-6b), 2.18, 2.12, 2.09, 2.04 (4s, 12H, 3OCOCH<sub>3</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 171.2 (C=O), 135.2 (CHar.), 129.1 (Car.), 124.2 (CHar.), 105.4 (C-1), 71.5, 69.5, 67.7, 61.9 (C-3, C-4, C-5, C-6), 47.7 (C-2), 21.1 (OCOCH<sub>3</sub>).

### O-α-D-galactopyrannosyl-N-acétylé-oxyamine : **40**

Au composé **39** dissous dans de l'éthanol (60 mL) est ajouté de l'hydrazine (7 équ.). La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit puis évaporée sous pression réduite. Le composé **40** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane 9 / éthanol 1, puis dichlorométhane 1 / éthanol 1) et lyophilisation.



→ Rendement : 90%.

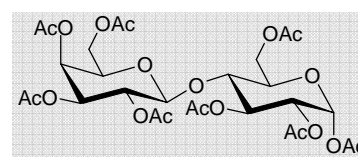
→ SM (ESI) : M<sub>calc</sub> pour [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>] = 237.10 ; M<sub>trouvée</sub> = 237.00

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 4.99 (d, 1H, <sup>J</sup><sub>1,2</sub> = 4.1 Hz, H-1), 4.24 (dd, 1H, <sup>J</sup><sub>2,3</sub> = 11.3 Hz, H-2), 4.03-3.99 (d, 2H, H-4, H-5), 3.89-3.76 (d, 3H, H-3, H-6), 2.08 (s, 3H, H<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 175.0 (H<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>), 101.0 (C-1), 71.4, 68.8 (C-4, C-5), 68.0 (C-3), 61.5 (C-6), 49.6 (C-2), 22.3 (H<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>).

### (1,2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4')-2',3',6'-Tétra-O-acétyl-α-D-glucopyrannosyle : **42**

Du L-lactose **41** (5 g ; 13.8 mmol) est dissous dans une solution anhydride acétique 1 / pyridine 2 (100 mL). Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé puis repris à l'éther. La phase organique est ensuite lavée plusieurs fois avec une



solution d'acide citrique (pH 3) puis à l'eau avant d'être séchée sur du sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient 8.89 g d'une huile correspondant au lactose  $\alpha$  et  $\beta$  peracétylé **42** utilisé directement sans plus de purification.

→ Rendement : 95%.

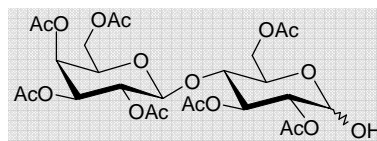
→ Point de fusion : 93-95°C.

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 6.16 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 3.7$  Hz, H-1'), 5.37 (t, 1H,  $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9.6$  Hz, H-3'), 5.27 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 0.7$  Hz,  $J_{3,4} = 3.4$  Hz, H-4), 5.03 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 7.8$  Hz,  $J_{2,3} = 10.2$  Hz, H-2), 4.92 (dd, 1H, H-2'), 4.88 (dd, 1H, H-3), 4.42 (d, 1H, H-1), 4.36 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 1.9$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12.1$  Hz, H-6a), 4.09-3.98 (m, 3H, H-6', H-6b), 3.93 (ddd, 1H,  $J_{5',6a'} = 1.7$  Hz,  $J_{5',6b'} = 4.1$  Hz,  $J_{4',5'} = 9.6$  Hz, H-5'), 3.82 (t large, 1H,  $J_{5,6} = 7.1$  Hz, H-5), 3.74 (t, 1H, H-4'), 2.10, 2.07, 2.04, 1.99, 1.98, 1.97, 1.92, 1.88 (8s, 24H,  $8\text{OCOCH}_3$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 170.7 (C=O), 170.6 (C=O), 170.4 (C=O), 170.3 (C=O), 170.3 (C=O), 169.9 (C=O), 169.4 (C=O), 169.2 (C=O), 101.5 (C-1), 89.3 (C-1'), 76.1 (C-4'), 71.3 (C-3), 71.1, 71.0 (C-5, C-5'), 69.9 (C-3'), 69.7 (C-2'), 69.4 (C-2), 67.0 (C-4), 61.8 (C-6), 61.2 (C-6'), 21.3 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 21.2 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 21.1 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 21.0 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 20.8 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

### (2,3,4,6-Tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-galactopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4')-2',3',6'-Tri-O-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyrannose : **43**

De l'acide acétique (0.35 mL ; 1.4 éq.) est ajouté goutte à goutte à une solution de THF (80 mL) contenant de l'éthylènediamine (0.35 mL ; 1.2 éq.). Un précipité blanc



apparaît aussitôt. Le dérivé peracétylé **42** (2.96 g ; 4.4 mmol) est ensuite ajouté et la solution est laissée sous agitation pendant une nuit à température ambiante. De l'eau (80 mL) est ensuite ajoutée au mélange réactionnel et la phase organique est extraite plusieurs fois avec du dichlorométhane puis lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique et de  $\text{NaHCO}_3$ . Elle est enfin séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée pour donner le produit **43** sous la forme d'une huile incolore utilisée sans autre purification.

→ Rendement : 93%.

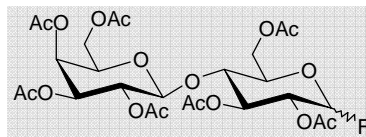
→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 5.49 (t,  $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9.7$  Hz, H-3' $_{\alpha}$ ), 5.34 (d,  $J_{1',2'} = 3.7$  Hz, H-1' $_{\alpha}$ ), 5.33 (d,  $J_{3_{\alpha},4_{\alpha}} = J_{3_{\beta},4_{\beta}} = 3.5$  Hz, H-4 $_{\alpha,\beta}$ ), 5.21 (t,  $J_{2'_{\beta},3'_{\beta}} = J_{3'_{\beta},4'_{\beta}} = 9.2$  Hz, H-3' $_{\beta}$ ), 5.09 (dd,  $J_{1_{\beta},2_{\beta}} = 7.8$  Hz,  $J_{2_{\beta},3_{\beta}} = 10.4$  Hz, H-2 $_{\beta}$ ), 5.07 (dd,  $J_{1_{\alpha},2_{\alpha}} = 7.8$  Hz,  $J_{2_{\alpha},3_{\alpha}} = 10.4$  Hz, H-2 $_{\alpha}$ ), 4.94 (dd, H-3 $_{\alpha,\beta}$ ), 4.80 (dd, H-2' $_{\alpha}$ ), 4.78 (dd,  $J_{1'_{\beta},2'_{\beta}} = 8.2$  Hz, H-2' $_{\beta}$ ), 4.74 (d, H-1' $_{\beta}$ ), 4.49-4.44 (m, H-1 $_{\beta}$ , H-6a' $_{\alpha}$ ), 4.48 (d, H-1 $_{\alpha}$ ), 4.16-4.03 (m, H-6 $_{\alpha}$ , H-6b' $_{\alpha}$ , H-5 $_{\beta}$ , H-5' $_{\beta}$ , H-6 $_{\beta}$ ), 3.86 (t,  $J_{5_{\alpha},6_{\alpha}} = 6.4$  Hz, H-5 $_{\alpha}$ ), 3.77-3.69 (H-4' $_{\alpha,\beta}$ ), 3.64 (ddd,  $J_{5'_{\alpha},6a'_{\alpha}} = 2.0$  Hz,  $J_{5'_{\alpha},6b'_{\alpha}} = 5.2$  Hz,  $J_{4'_{\alpha},5'_{\alpha}} = 9.9$  Hz, H-5' $_{\alpha}$ ), 2.13-1.99 (14s, 14  $\text{OCOCH}_3$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 171.3 (C=O), 171.0 (C=O), 170.8 (C=O), 170.6 (C=O), 170.6 (C=O), 170.5 (C=O), 170.1 (C=O), 169.4 (C=O), 101.4 (C-1 $_{\beta}$ ), 101.3 (C-1 $_{\alpha}$ ), 95.6 (C-1' $_{\beta}$ ), 90.4 (C-1' $_{\alpha}$ ), 76.7 (C-4' $_{\alpha}$ ), 76.6 (C-4' $_{\beta}$ ), 73.8 (C-2' $_{\alpha}$ ), 73.3 (C-5' $_{\alpha}$ ), 72.6 (C-3' $_{\beta}$ ), 71.7 (C-2' $_{\alpha}$ ), 71.5 (C-3 $_{\alpha}$ ), 71.4 (C-3 $_{\beta}$ , C-5 $_{\beta}$  ou C-5' $_{\beta}$ ), 71.1 (C-3 $_{\beta}$ , C-5 $_{\beta}$  ou C-5' $_{\beta}$ ), 71.0 (C-5 $_{\alpha}$ ), 70.0 (C-3' $_{\alpha}$ ), 69.6 (C-2 $_{\alpha}$ ), 69.5 (C-2 $_{\beta}$ ), 68.6 (C-5 $_{\beta}$  ou C-5' $_{\beta}$ ), 67.1 (C-4 $_{\alpha}$ ), 67.0

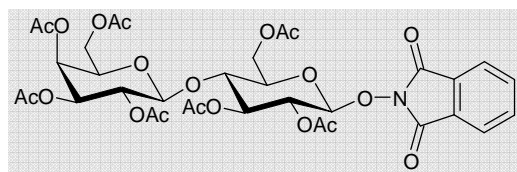
(C-4<sub>β</sub>), 62.5 (C-6'<sub>β</sub> ou C-6<sub>β</sub>), 62.3 (C-6'<sub>α</sub>), 61.2 (C-6<sub>α</sub>), 61.1 (C-6'<sub>β</sub> ou C-6<sub>β</sub>), 21.3 (OCOCH<sub>3</sub>), 21.2 (OCOCH<sub>3</sub>), 21.0 (OCOCH<sub>3</sub>), 20.9 (OCOCH<sub>3</sub>).

***O*-(2,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4')-(2',3',6'-Tri-*O*-acétyl-β-D-glucopyrannosyl)-*N*-oxyphthalimide : 45**

Dans une première étape, la fluoration est réalisée selon la procédure décrite pour le produit 26. Le dérivé 44 est utilisé directement sans purification.



On suit la procédure décrite pour le produit 27. Le composé 45 est obtenu après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane 4 / acétate d'éthyle 1) et précipitation dans un mélange dichlorométhane / pentane.



→ Rendement : 70%.

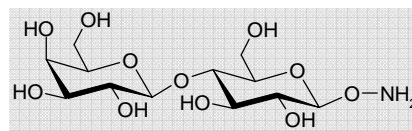
→ Point de fusion : 106-108°C.

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 7.86-7.74 (m, 4H, Har.), 5.34 (dd, 1H, J<sub>4',5'</sub> = 0.9 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3.3 Hz, H-4'), 5.28-5.18 (m, 2H, H-2, H-3), 5.14 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 6.9 Hz, H-1), 5.10 (dd, 1H, J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 10.4 Hz, H-2'), 4.95 (dd, 1H, H-3'), 4.53 (d, 1H, H-1'), 4.42 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 2.2 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 12.1 Hz, H-6a), 4.15 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 5.8 Hz, H-6b), 4.11-4.07 (m, 3H, H-4, H-6'), 3.88 (td, 1H, J<sub>5',6'</sub> = 6.8 Hz, H-5'), 3.78-3.73 (m, 1H, H-5), 2.16, 2.13, 2.08, 2.06, 2.05, 2.03, 1.94 (7s, 21H, 7OCOCH<sub>3</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ ppm 170.8 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.7 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.4 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.0 (C=O<sub>Ac</sub>), 169.9 (C=O<sub>Ac</sub>), 169.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 163.1 (C=O<sub>PhI</sub>), 135.1 (CHar.), 129.1 (Car.), 124.2 (CHar.), 104.5 (C-1), 101.5 (C-1'), 76.3 (C-4), 73.3, 73.1 (C-3, C-5), 71.4, 71.1 (C-3', C-5'), 70.4 (C-2), 69.4 (C-2'), 67.1 (C-4'), 62.5 (C-6), 61.3 (C-6'), 21.2 (OCOCH<sub>3</sub>), 21.1 (OCOCH<sub>3</sub>), 21.0 (OCOCH<sub>3</sub>), 20.9 (OCOCH<sub>3</sub>).

***O*-(β-D-galactopyrannosyl)-(1→4')-β-D-glucopyrannosyl-oxyamine : 46**

Le produit 45 est déprotégé par la méthylhydrazine selon la procédure décrite pour le produit 40. Le produit 46 est récupéré après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane 1 / éthanol 1 puis dichlorométhane 1 / éthanol 9) et lyophilisation.



→ Rendement : 60%.

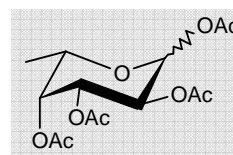
→ SM (ESI) : M<sub>calc</sub> pour [C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>11</sub>] = 358.13 ; M<sub>trouvée</sub> = 358.15

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 4.62 (d, 1H,  $J_{1,2'} = 8.3$  Hz, H-1'), 4.47 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.7$  Hz, H-1), 4.03 (dd, 1H,  $J_{5',6a'} = 1.3$  Hz,  $J_{6a',6b'} = 11.6$  Hz, H-6a'), 3.95 (d large, 1H,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-4), 3.84 (dd, 1H,  $J_{5',6b'} = 4.6$  Hz, H-6b'), 3.79-3.63 (m, 7H, H-3, H-5, H-6, H-3', H-4', H-5'), 3.66 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.8$  Hz, H-2), 3.38 (t large, 1H,  $J_{2,3'} = 8.4$  Hz, H-2').

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  ppm 105.2 (C-1'), 103.3 (C-1), 78.6, 75.7, 75.1, 74.8, 72.8, 71.7 (C-2'), 71.3 (C-2), 68.9 (C-4), 61.4 (C-6'), 60.4 (C-6).

### 1,2,3,4,-Tetra-O-acétyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyrannosyle:

Du L-fucose **47** (5g ; 30.5 mmol) est dissous dans une solution d'anhydride acétique 1 / Pyridine 2 (150mL). Après une nuit sous agitation a température ambiante, le milieu réactionnel est concentré



sous pression réduite puis repris a l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée plusieurs fois à l'acide citrique (pH 3) puis a l'eau avant d'être séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. On obtient 9.74 g d'une poudre blanche après précipitation dans le pentane correspondant au produit **48**.

→ Rendement : 97%.

→ Point de fusion : 90-92°C

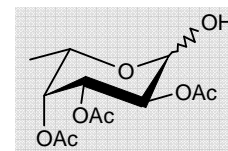
→ SM (ESI) :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{Na}] = 355.10$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 354.94$ .

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 6.36 (d, 1H,  $J_{1,2} = 2.7$  Hz, H-1), 5.36-5.34 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.29 (q large, 1H,  $J_{4,5} = 6.5$  Hz, H-5), 2.20 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.16 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.03 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.18 (d, 3H,  $J_{5,\text{Me}} = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 170.9 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.3 (C=O<sub>Ac</sub>), 169.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 90.3 (C-1), 70.9 (C-2, C-3 or C-4), 68.2 (C-2, C-3 or C-4), 67.7 (C-5), 66.9 (C-2, C-3 or C-4), 21.3 ( $\text{COCH}_3$ ), 21.1 ( $\text{COCH}_3$ ), 21.0 ( $\text{COCH}_3$ ), 20.9 ( $\text{COCH}_3$ ), 16.3 ( $\text{CH}_3$ ).

### 2,3,4-Tri-O-acétyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyrannose :

De l'acide acétique (2.35 mL ; 1.4 éq) est ajouté goutte a goutte a une solution de THF (400 mL) contenant de l'éthylènediamine (2.35 mL ; 1.2 eq). Un précipité blanc apparaît aussitôt. Le fucose peracétylé **48** (9.74g,



29,3 mmol) est ajouté a la solution et laissé sous agitation a température ambiante pendant une nuit. De l'eau (200 mL) est ensuite ajoutée au mélange réactionnel et la phase organique est extraite plusieurs fois avec de l'acetate d'éthyle puis lavée Successivement avec une solution d'acide chlorydrique et d'une solution aqueuse de carbonate de sodium. Elle est enfin séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est



finaleme nt chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane/ Acétate d'éthyle 9/1) pour donner 7.3 g d'une huile incolore correspondant au produit **49**.

→ **Rendement** : 86%.

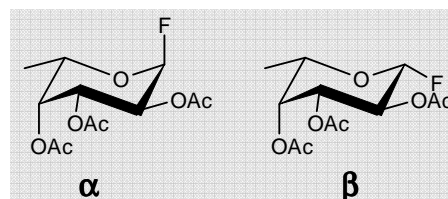
→ **SM (ESI)** :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{12}H_{18}O_8Na]$  = 313.09 ;  $M_{\text{trouvée}}$  = 313.17.

→ **RMN  $^1H$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  ppm 5.46 (d,  $J_{1,2}$  = 3.3 Hz, H-1) 5.43 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  = 4 Hz,  $J_{3,2}$  = 3.3 Hz, H-3), 5.31 (dd, 1H,  $J_{4,3}$  = 4 Hz,  $J_{4,5}$  = 1.3 Hz, H-4), 5.12 (d, 1H,  $J_{2,3}$  = 3.3 Hz,  $J_{2,1}$  = 3.3 Hz, H-2), 4.39 (q large, 1H,  $J_{5,Me}$  = 6.6 Hz, H-5), 2.17 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.10 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.01 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 1.23 (d, 3H,  $J_{Me,5}$  = 6.6 Hz,  $CH_3$ ).

→ **RMN  $^{13}C$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  ppm 170.26 ( $C=O_{Ac}$ ), 170.10 ( $C=O_{Ac}$ ), 170.07 ( $C=O_{Ac}$ ), 92.0 (C-1), 71.1 (C-2, C-3 ou C-4), 70.3 (C-2, C-3 ou C-4), 68.7 (C-2, C-3 ou C-4), 60.4 (C-5), 20.8 ( $COCH_3$ ), 20.7 ( $COCH_3$ ), 20.6 ( $COCH_3$ ), 15.9 ( $CH_3$ ).

### Fluorure de 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranosyle : **50** et **51**

Le produit précédent (1.98 g ; 6.8 mmol) est dissous dans du THF (10 mL) et refroidi a  $-30^\circ C$ . Du trifluorure de diéthylaminosulfure (1.08 mL ; 1.2 eq) est alors ajouté puis le milieu réactionnel est laissé sous agitation à



température ambiante pendant 30 minutes. Le mélange est a nouveau refroidi a  $-30^\circ C$ , puis du méthanol (2 mL) est ajouté et la solution laissée a température ambiante quelques minutes. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris avec du dichlorométhane et lavé avec une solution aqueuse de  $NaHCO_3$ . La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : hexane 4 / Ether 6) pour donner 1,43 g du produit fluoré. Les isomères  $\alpha$  et  $\beta$  sont séparés lors de cette purification.

- Anomère  $\alpha$  : **50**

→ **Rendement** : 39%.

→ **Pouvoir rotatoire** :  $[\alpha]_D^{20}$   $-85.5^\circ C$

→ **SM (ESI)** :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[C_{12}H_{17}FO_7Na]$  = 315.08 ;  $M_{\text{trouvée}}$  = 314.89

→ **RMN  $^1H$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  ppm 5.87 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  = 2.7 Hz,  $J_{1,F}$  = 53.7 Hz, H-1), 5.51-5.46 (m, 2H, H-3, H-4), 5.29 (dddd, 1H,  $J_{2,4}$  = 1.2 Hz,  $J_{1,2}$  = 2.7 Hz,  $J_{2,3}$  = 11.7 Hz,  $J_{2,F}$  = 23.6 Hz, H-2), 4.46 (q large, 1H,  $J_{5,CH_3}$  = 6.5 Hz, H-5), 2.29 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.23 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.13 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 1.31 (d, 3H,  $J_{CH_3,5}$  = 6.5 Hz,  $CH_3$ ).

→ **RMN  $^{13}C$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  ppm 170.7 ( $C=O_{Ac}$ ), 170.6 ( $C=O_{Ac}$ ), 170.3 ( $C=O_{Ac}$ ), 104.9 (d,  $J_{C-1,F}$  226 Hz, C-1), 70.7 (C-4), 67.8 (d,  $J_{C-2,F}$  30 Hz, C-2), 67.7 (d,  $J_{C-2,F}$  9 Hz, C-3), 65.6 (C-5), 20.9 ( $COCH_3$ ), 21.0 ( $COCH_3$ ), 21.1 ( $COCH_3$ ), 18.2 ( $CH_3$ ).

- Anomère  $\beta$  : **51**

→ Rendement : 33%.

→ Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{20} = -48.1^\circ\text{C}$ .

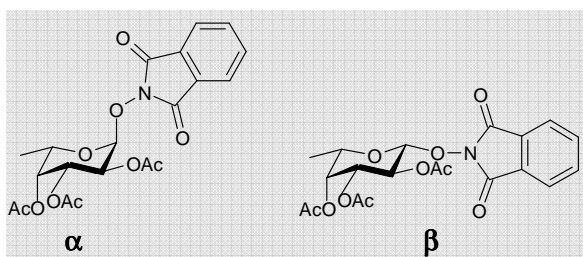
→ SM (ESI) :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{FO}_7\text{Na}] = 315.08$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 314.87$

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 5.21-5.13 (m, 2H, H-3, H-4), 5.03 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 7.2$  Hz,  $J_{1,F} = 51$  Hz, H-1), 4.95-4.91 (m, 1H, H-2), 3.81 (q large, 1H,  $J_{4,5} = 6.4$  Hz, H-5), 1.88 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.98 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.08 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.17 (d, 3H,  $J_{5,\text{CH}_3} = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 170.8 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 170.4 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 169.7 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 107.5 (d,  $J_{\text{C-1,F}} = 216$  Hz, C-1), 70.8 (d,  $J_{\text{C-2,F}} = 45$  Hz, C-2), 70.1 (C-4), 69.9 (C-5), 69.3 (C-3), 20.9 ( $\text{COCH}_3$ ), 21.0 ( $\text{COCH}_3$ ), 21.1 ( $\text{COCH}_3$ ), 16.2 ( $\text{CH}_3$ ).

### *O*-(2,3,6-tri-*O*-acetyl)- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranosyl-*N*-oxyphtalimide : 52 et 53

A une solution composée du produit fluoré (100 mg, 0,342 mmol), d'hydroxyphtalimide (55, 9 mg, 1eq) et de triéthylamine (48  $\mu\text{L}$ , 1eq) dans du dichlorométhane (Acétonitrile ou THF) anhydre (3mL) est ajouté du



BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (173  $\mu\text{L}$ , 4 eq). La décoloration immédiate de la solution indique la fin de la réaction. Du dichlorométhane est alors ajouté puis la phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis de l'eau, séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le mélange d'anomères est purifié par chromatographie de gel de silice flash (éluant : hexane/éther 4/6) pour donner les anomères  $\alpha$  52 et  $\beta$  53 purs.

- Anomère  $\alpha$  : 52

→ Rendement : 25%.

→ Point de fusion : 92-94°C

→ Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{20} -157.1^\circ\text{C}$

→ SM (ESI) :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_{10}\text{Na}] = 458.10$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 457.96$

→ RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.87-7.76 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{Ph}}$ ), 5.59 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz, H-1), 5.55 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz,  $J_{2,3} = 11.2$  Hz, H-3), 5.45 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 1.1$  Hz,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz, H-4), 5.27 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz,  $J_{2,3} = 11.2$  Hz, H-2), 5.09 (q large, 1H,  $J_{5,\text{CH}_3} = 6.3$  Hz), 2.23 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.20 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.05 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.21 (d, 3H,  $J_{\text{CH}_3,5} = 6.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

→ RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 171.2 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 170.8 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 170.2 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 163.5 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ph}}$ ), 135.1 ( $\text{CH}_{\text{Ph}}$ ), 129.2 ( $\text{C}_{\text{Ph}}$ ), 124.1 ( $\text{CH}_{\text{Ph}}$ ), 102.5 (C-1), 71.3 (C-4), 67.6 (C-2 or C-3), 67.5 (C-2 or C-3), 67.4 (C-5), 21.2 ( $\text{COCH}_3$ ), 21.1 ( $\text{COCH}_3$ ), 20.9 ( $\text{COCH}_3$ ), 16.2 ( $\text{CH}_3$ ).

- Anomère  $\beta$  : **53**

→ **Rendement** : 36%.

→ **Point de fusion** : 92-94°C

→ **Pouvoir rotatoire** :  $[\alpha]_D^{20} = +7.6^\circ\text{C}$ .

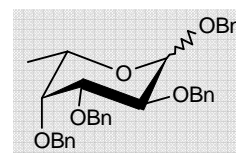
→ **SM (ESI)** :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_{10}\text{Na}] = 458.10$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 457.98$

→ **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.90-7.77 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{PhI}}$ ), 5.46 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 8.3$  Hz,  $J_{2,3} = 10.3$  Hz, H-2) 5.29-5.27 (m, 1H, H-4), 5.12 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.4$  Hz,  $J_{2,3} = 10.3$  Hz, H-3), 4.99 (q, 1H,  $J_{1,2} = 8.3$  Hz, H-1), 3.84 (q large, 1H,  $J_{4,5} = 6.3$  Hz), 2.24 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.23 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.03 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.27 (d, 3H,  $J_{\text{CH}_3,5} = 6.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

→ **RMN  $^{13}\text{C}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 171.2 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 170.5 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 170.3 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 163.1 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{PhI}}$ ), 135.1 ( $\text{CH}_{\text{PhI}}$ ), 129.2 ( $\text{C}_{\text{PhI}}$ ), 124.2 ( $\text{CH}_{\text{PhI}}$ ), 106.8 (C-1), 71.4 (C-3), 70.6 (C-5), 70.1 (C-4), 67.5 (C-2), 21.2 ( $\text{COCH}_3$ ), 21.1 ( $\text{COCH}_3$ ), 20.9 ( $\text{COCH}_3$ ), 16.4 ( $\text{CH}_3$ ).

### 1,2,3,4,-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyrannosyle

Dans un bain de glace, de l'hydruire de sodium à 60% en dispersion dans une huile minérale (2.2 g ; 8 éq.) est ajouté en plusieurs portions à une solution de L-fucose **47** (2 g ; 11,5 mmol) dans du DMF (75 mL). Après une heure d'agitation, du bromure de benzyle (10,9 mL ; 8 eq) est ajouté et la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Après addition de méthanol (15 mL), le mélange est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le résidu obtenu est finalement chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane) pour donner 5,8 g d'une huile incolore correspondant au produit.



→ **Rendement** : 96%.

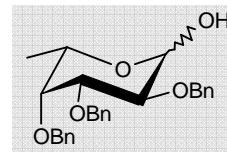
→ **SM (ESI)** :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}] = 547.25$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 547.07$

→ **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.34-7.18 (m, H, Har., 20H), 5.22 (d large, 1H, H-1), 4.93-4.85 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C}_1$ ), 4.72-4.35 (m, 6H,  $3\times\text{CH}_2$ ), 3.94 (qd, 1H,  $J_{5,\text{Me}} = 6.6$  Hz,  $J_{5,4} = 3.6$  Hz, H-5), 3.81 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 7.5$  Hz,  $J_{2,3} = 9.6$  Hz, H-2), 3.50-3.35 (m, 2H, H-3, H-4) 1.14 (d, 3H,  $J_{5,\text{Me}} = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

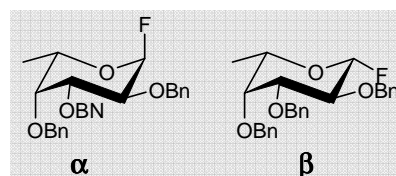
→ **RMN  $^{13}\text{C}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 100.3 (C-1), 82.3 (C-3), 80.2 (C-4), 73.9 (C-2), 75.4 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 74.1 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 71.4 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 70.9 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 72.1 (C-5), 18.0 ( $\text{CH}_3$ ).

## Fluorure de 2,3,4-tri-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranosyle : 54 et 55

Le composé benzylé est dissous dans une solution d'acide acétique et d'acide sulfurique 1M (4/1 ; 100 mL) et le mélange est chauffé à 90°C pendant 6 heures. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite puis reprise avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le produit est utilisé sans autre purification lors de l'étape de fluoruration.



Les composés fluorés sont préparés selon le même protocole que 50 et 51. Les anomères fluorés sont obtenus sous forme d'huile incolore après purification sur colonne de gel de silice (éluant : hexane/acétate d'éthyle 9/1).



### - Anomère $\alpha$ : 54

→ Rendement : 25%

→ SM (ESI) :  $M_{\text{calc}}$  pour [C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na] = 457.20 ;  $M_{\text{trouvée}}$  = 457.00

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  ppm 7.41-7.27 (m, 15H, H<sub>Bn</sub>), 5.57 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 2.8$  Hz,  $J_{1,F} = 54$  Hz, H-1), 4.99-4.66 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 4.05 (q large, 1H,  $J_{4,5} = 1.1$  Hz,  $J_{5,6} = 6.6$  Hz, H-5), 4.04 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 2.8$  Hz,  $J_{2,3} = 10.1$  Hz,  $J_{2,F} = 25.1$  Hz, H-2), 3.94 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 2.7$  Hz,  $J_{2,3} = 10.1$  Hz, H-3), 3.70 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 1.1$  Hz,  $J_{3,4} = 2.7$  Hz, H-4), 1.16 (d, 3H,  $J_{5,\text{Me}} = 6.6$  Hz, CH<sub>3</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  ppm 139.04 (C<sub>Bn</sub>), 138.91 (C<sub>Bn</sub>), 138.57 (C<sub>Bn</sub>), 128.81 (CH<sub>Bn</sub>), 128.78 (CH<sub>Bn</sub>), 128.61 (CH<sub>Bn</sub>), 128.39 (CH<sub>Bn</sub>), 127.99 (CH<sub>Bn</sub>), 127.90 (CH<sub>Bn</sub>), 98.09 (C-1), 83.30 (C-3), 82.96 (C-4), 79.46 (C-2), 75.15 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.94 (PhCH<sub>2</sub>O), 73.37 (PhCH<sub>2</sub>O), 67.13 (C-5), 17.13 (CH<sub>3</sub>).

### - Anomère $\beta$ : 55

→ Rendement : 23%

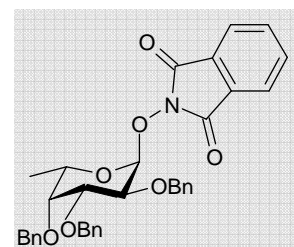
→ SM (ESI) :  $M_{\text{calc}}$  pour [C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Na] = 457.20 ;  $M_{\text{trouvée}}$  = 457.00

→ RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  ppm 7.31-7.18 (m, 15H, H<sub>Bn</sub>), 5.16 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 2.7$  Hz,  $J_{1,F} = 18.6$  Hz, H-1), 4.94-4.50 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 4.14 (q large, 1H,  $J_{4,5} = 1.1$  Hz,  $J_{5,6} = 5.7$  Hz, H-5), 3.98 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 2.7$  Hz,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz, H-2), 3.94 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 2.7$  Hz,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz, H-3), 3.59 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 1.1$  Hz,  $J_{3,4} = 2.7$  Hz, H-4), 1.07 (d, 3H,  $J_{5,\text{Me}} = 5.7$  Hz, CH<sub>3</sub>).

→ RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  ppm 139.32 (C<sub>Bn</sub>), 139.04 (C<sub>Bn</sub>), 138.56 (C<sub>Bn</sub>), 128.81 (CH<sub>Bn</sub>), 128.78 (CH<sub>Bn</sub>), 128.70 (CH<sub>Bn</sub>), 128.63 (CH<sub>Bn</sub>), 128.61 (CH<sub>Bn</sub>), 128.55 (CH<sub>Bn</sub>), 128.40 (CH<sub>Bn</sub>), 128.23 (CH<sub>Bn</sub>), 92.27 (C-1), 82.96 (C-3), 82.11 (C-4), 79.57 (C-2), 75.28 (CH<sub>2</sub>), 75.16 (CH<sub>2</sub>), 73.95 (CH<sub>2</sub>), 67.13 (C-5), 16.99 (CH<sub>3</sub>).

**O-(2,3,6-tri-O-benzyl)- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-N-oxyphtalimide : 56**

Le composé **56** est obtenu selon le même protocole que celui de **52** et **53** et après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane/acétate d'éthyle 7/3).



→ **Rendement** : 63%.

→ **Point de fusion** : 53-55°C

→ **Pouvoir rotatoire** :  $[\alpha]_D^{20} = -64.1^\circ\text{C}$

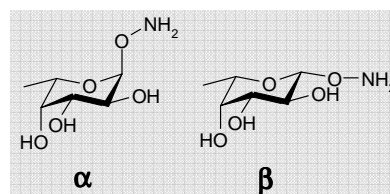
→ **SM (ESI)** :  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{NO}_7\text{Na}] = 602.21$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 602.02$

→ **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 7.86-7.73 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{PhI}}$ ), 7.56-7.29 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{Bn}}$ ), 5.62 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.8$  Hz, H-1), 5.11-4.66 (m, 7H, H-5,  $3\times\text{CH}_2$ ), 4.26 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz,  $J_{2,3} = 10.3$  Hz, H-2), 4.13 (d, 1H,  $J_{3,4} = 2.7$  Hz,  $J_{2,3} = 10.3$  Hz, H-3), 3.78 (d large, 1H,  $J_{2,3} = 2.7$  Hz, H-4), 1.14 (d, 3H, 3H,  $J_{\text{CH}_3,5} = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

→ **RMN  $^{13}\text{C}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ppm 163.5 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{PhI}}$ ), 138.8 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 138.4 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 138 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 134.4 ( $\text{CH}_{\text{PhI}}$ ), 129.0 ( $\text{C}_{\text{PhI}}$ ), 128.4 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 128.4 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 128.3 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 128.2 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 127.6 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{Bn}}$ ), 123.5 ( $\text{CH}_{\text{PhI}}$ ), 102.7 (C-1), 78.5 (C-3), 77.8 (C-4), 75.3 (C-2), 75.0 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 73.7 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 72.8 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 69.1 (C-5), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ).

**O- $\alpha/\beta$ -D-fucopyranosyl-oxyamine : 58 et 59**

Le composé **52** (286mg, 0,66mmol) est dissous dans une solution d'éthanol/méthylhydrazine (1/1). La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit puis évaporée sous pression réduite. Le composé huileux **58** obtenu est ensuite recristallisé dans de l'éthanol. Le composé **59** est obtenu de la même manière que précédemment après purification par chromatographie de gel de silice (éluant dichlorométhane/éthanol 7/3).



- Anomère  $\alpha$  : **58**

→ **Rendement** : 51%.

→ **Point de fusion** : 147-150°C

→ **Pouvoir rotatoire** :  $[\alpha]_D^{20} -131.2^\circ\text{C}$

→ **SM (ESI, m/z)**:  $M_{\text{calc}}$  pour  $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{Na}] = 202.07$  ;  $M_{\text{trouvée}} = 201.71$

→ **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  ppm 4.96 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz, H-1), 4.10 (q large, 1H,  $J_{5,\text{CH}_3} = 6.5$  Hz, H-5), 3.83-3.80 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 1.24 (d, 3H,  $J_{5,\text{CH}_3} = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

→ **RMN  $^{13}\text{C}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  ppm 102.2 (C-1), 72.2 (C-2, C-3 or C-4), 69.9 (C-2, C-3 or C-4), 68.0 (C-2, C-

3 or C-4), 67.1 (C-5), 15.7 (CH<sub>3</sub>).

- Anomère β :

→ **Point de fusion** : 172-174°C

→ **Pouvoir rotatoire** :  $[\alpha]_D^{20} +2.8^\circ\text{C}$

→ **SM (ESI, m/z)**:  $M_{\text{calc}}$  pour [C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>Na] = 202.07 ;  $M_{\text{trouvée}} = 201.70$

→ **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ ppm 4.50 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1), 3.81 (q large, 1H,  $J_{5,\text{CH}_3} = 6.4$  Hz, H-5), 3.77-3.75 (m, 1H, H-4), 3.67 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.4$  Hz,  $J_{2,3} = 9.6$  Hz, H-3), 3.51 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz,  $J_{2,3} = 9.6$  Hz, H-2), 1.28 (d, 3H,  $J_{5,\text{CH}_3} = 6.4$  Hz, CH<sub>3</sub>).

→ **RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ ppm 105.9 (C-1), 73.4 (C-3), 71.7 (C-4), 71.2 (C-5), 69.5 (C-2), 15.7 (CH<sub>3</sub>).

### 3.3 Synthèses des bibliothèques:

#### Bibliothèques de molécules par lien oxime:

- **Synthèse:**

A 1 éq. de RAFT **6** est additionné un total de 12 éq. de réactifs fonctionnalisés oxyamine. Le mélange est agité pendant 1 à 2 heures et l'avancement de la réaction est suivi par CLHP analytique à 214 et 250 nm. Les mélanges sont ensuite purifiés afin d'éliminer l'excès de réactifs oxyamines puis lyophilisés pour obtenir les produits sous forme de poudre blanche.

	1 Ligand oxyamine (10mg/mL)	2 Ligands oxyamine (10mg/mL)	3 Ligands oxyamine (10mg/mL)	4 Ligands oxyamine (10mg/mL)
Eq.	12	6	4	3
Total d'éq.	12	12	12	12

- **Purification:**

Les bibliothèques de molécules sont purifiées par action d'un gel d'agarose fonctionnalisé par des fonctions aldéhydes. Le gel est tout d'abord lavé plusieurs fois à l'eau Milli-Q. On laisse le gel décanter plusieurs fois et on prélève le surnageant. Ces opérations sont réalisées jusqu'à obtenir un surnageant limpide. Ensuite on prélève 400 µL (correspond à 12 éq. de fonction aldéhyde par rapport au RAFT) de gel que l'on ajoute à chaque mélange à purifier. On laisse sous agitation mécanique pendant 6 h puis on filtre. On rince plusieurs fois le gel à l'eau et l'acétonitrile puis le filtrat est mis à lyophiliser. L'ensemble des bibliothèques sont récupérées sous forme de poudre blanche.

• **Couplage combinatoire chimiosélectif Peptides 7-10/RAFT**

Pour les peptides **7** à **10** les solutions stocks sont faites dans du DMSO. Les proportions utilisés sont les suivantes:

couplage pour 1mg de RAFT n = 0.842µmol			
quantité de peptides pour les couplages			
peptides	nb peptide	équivalent	masse (mg)
7	1	12	7.32
8	1	12	6.26
9	1	12	9.31
10	1	12	11.95
7	2	6	3.66
8	2	6	3.13
9	2	6	4.65
10	2	6	5.98
7	3	4	2.44
8	3	4	2.08
9	3	4	3.10
10	3	4	3.99
7	4	3	1.83
8	4	3	1.57
9	4	3	2.33
10	4	3	2.99
Peptides en solution dans DMSO (10mg/mL)			
RAFT(4CHO, 2Ala) en solution dans solvant A (10mg/mL)			

Les sous bibliothèques et bibliothèques sont analysées par CLHP analytique et les composés identifiés par superposition des profil CLHP et spectrométrie de masse (LC-MS, ESI)

- Sous bibliothèque à 1 peptide:

Peptide	Conjugué RAFT/peptide	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-60% de B en 15 min)	SM (ESI)	
					M calculée	M trouvée
<u>7</u>	RAFT(7) <sub>4</sub>	1 heure	50%	t <sub>R</sub> = 11.45 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4012.14</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1338.7
<u>8</u>	RAFT(8) <sub>4</sub>	1 heure	83%	t <sub>R</sub> = 15.43 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4799.42</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1600.3
<u>9</u>	RAFT(9) <sub>4</sub>	1 heure	78%	t <sub>R</sub> = 10.55 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>3592.09</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1198.4
<u>10</u>	RAFT(10) <sub>4</sub>	1 heure	76%	t <sub>R</sub> = 11.42 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>5548</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1968.9

- Sous bibliothèques à 2 peptides:

Peptide	Conjugué RAFT/peptide	Temps réact.	Rendement estimé (en %)	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-60% de B en 15 min)	SM (ESI)	
					M calculée	M trouvée
<u>7+8</u>	RAFT(7) <sub>4</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (8) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (8) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>3</sub> RAFT(8) <sub>4</sub>	1 heure	84%	t <sub>R</sub> = 11.45 minutes t <sub>R</sub> = 12.67 minutes t <sub>R</sub> = 13.72 minutes t <sub>R</sub> = 14.65 minutes t <sub>R</sub> = 15.50 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4012.14</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4208.45</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4404.76</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4601.07</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4799.42</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1339.10 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1404.49 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1469.93 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1535.37 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1600.80

<u>7+9</u>	RAFT(7) <sub>4</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (9) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (9) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (9) <sub>3</sub> RAFT(9) <sub>4</sub>	1 heure	47%	t <sub>R</sub> = 11.45 minutes t <sub>R</sub> = 11.15 minutes t <sub>R</sub> = 10.93 minutes t <sub>R</sub> = 10.70minutes t <sub>R</sub> = 10.42 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4012.14</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3897.04</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3791.94</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3686.84</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3592.09</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1339.10 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1303.38 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1268.80 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1233.60 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1198.50
<u>7+10</u>	RAFT(7) <sub>4</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (10) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (10) <sub>3</sub> RAFT(10) <sub>4</sub>	1 heure	74%	t <sub>R</sub> = 11.45 minutes t <sub>R</sub> = 11.44 minutes t <sub>R</sub> = 11.435 minutes t <sub>R</sub> = 11.43minutes t <sub>R</sub> = 11.42 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4012.14</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4470.53</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4928.83</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5387.13</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5845.43</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1339.10 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1491.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1644.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1797.50 [M+3H] <sup>3+</sup> = x
<u>8+9</u>	RAFT(8) <sub>4</sub> RAFT(8) <sub>3</sub> (9) <sub>1</sub> RAFT(8) <sub>2</sub> (9) <sub>2</sub> RAFT(8) <sub>1</sub> (9) <sub>3</sub> RAFT(9) <sub>4</sub>	1 heure	81%	t <sub>R</sub> = 15.50 minutes t <sub>R</sub> = 14.53 minutes t <sub>R</sub> = 13.45 minutes t <sub>R</sub> = 12.15 minutes t <sub>R</sub> = 10.42 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4799.42</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4497.58</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4195.75</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3893.92</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3592.09</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1600.80 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1499.60 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1399.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1299.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1198.50
<u>8+10</u>	RAFT(8) <sub>4</sub> RAFT(8) <sub>3</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(8) <sub>2</sub> (10) <sub>2</sub> RAFT(8) <sub>1</sub> (10) <sub>3</sub> RAFT(10) <sub>4</sub>	1 heure	63%	t <sub>R</sub> = 15.50 minutes t <sub>R</sub> = 14.63 minutes t <sub>R</sub> = 13.55 minutes t <sub>R</sub> = 12.57 minutes t <sub>R</sub> = 11.42 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4799.42</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5060.93</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5322.43</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5583.93</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5845.43</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1600.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1687.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1775.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1862.50 [M+3H] <sup>3+</sup> = x
<u>9+10</u>	RAFT(9) <sub>4</sub> RAFT(9) <sub>3</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(9) <sub>2</sub> (10) <sub>2</sub> RAFT(9) <sub>1</sub> (10) <sub>3</sub> RAFT(10) <sub>4</sub>	1 heure	89%	t <sub>R</sub> = 10.55 minutes t <sub>R</sub> = 10.80 minutes t <sub>R</sub> = 11.10 minutes t <sub>R</sub> = 11.33 minutes t <sub>R</sub> = 11.42 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>3592.09</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4155.43</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4717.77</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5282.11</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5845.43</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1198.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1386.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1574.00 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1762.00 [M+3H] <sup>3+</sup> = x

Sous bibliothèques à 3 peptides:

Peptide	Conjugué RAFT/peptide	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5- 60% de B en 15 min)	SM (ESI)	
					M calculée	M trouvée
<u>7+8+9</u>	RAFT(7) <sub>4</sub> RAFT(8) <sub>4</sub> RAFT(9) <sub>4</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (8) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (8) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>3</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (9) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (9) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (9) <sub>3</sub> RAFT(8) <sub>3</sub> (9) <sub>1</sub> RAFT(8) <sub>2</sub> (9) <sub>2</sub> RAFT(8) <sub>1</sub> (9) <sub>3</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (8) <sub>1</sub> (9) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>2</sub> (9) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>1</sub> (9) <sub>2</sub>	2 heures	57%	t <sub>R</sub> = 11.45 minutes t <sub>R</sub> = 15.50 minutes t <sub>R</sub> = 10.42 minutes t <sub>R</sub> = 12.67 minutes t <sub>R</sub> = 13.72 minutes t <sub>R</sub> = 14.65 minutes t <sub>R</sub> = 11.15 minutes t <sub>R</sub> = 10.93 minutes t <sub>R</sub> = 10.70minutes t <sub>R</sub> = 14.53 minutes t <sub>R</sub> = 13.45 minutes t <sub>R</sub> = 12.15 minutes t <sub>R</sub> = 12.52 minutes t <sub>R</sub> = 13.62 minutes t <sub>R</sub> = 12.35 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4012.14</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4799.42</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5845.43</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4208.45</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4404.76</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4601.07</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3897.04</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3791.94</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3686.84</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4497.58</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4195.75</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3893.92</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4102.79</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4299.66</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3988.25</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1339.10 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1600.80 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1198.50 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1404.49 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1469.93 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1535.37 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1303.38 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1268.80 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1233.60 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1499.60 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1399.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1299.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1366.90 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1434.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1333.90
<u>7+8+10</u>	RAFT(7) <sub>4</sub> RAFT(8) <sub>4</sub> RAFT(10) <sub>4</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (8) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (9) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>3</sub> RAFT(7) <sub>3</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (10) <sub>2</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (10) <sub>3</sub> RAFT(8) <sub>3</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(8) <sub>2</sub> (10) <sub>2</sub> RAFT(8) <sub>1</sub> (10) <sub>3</sub> RAFT(7) <sub>2</sub> (8) <sub>1</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>2</sub> (10) <sub>1</sub> RAFT(7) <sub>1</sub> (8) <sub>1</sub> (10) <sub>2</sub>	2 heures	62%	Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics Massif de pics t <sub>R</sub> = 12.70 minutes t <sub>R</sub> = 13.68 minutes t <sub>R</sub> = 12.55 minutes	M <sub>calc.</sub> = <b>4012.14</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4799.42</b> M <sub>calc.</sub> = <b>3791.94</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4208.45</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4404.76</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4601.07</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4470.53</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4928.83</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5387.13</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5060.93</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5322.43</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5583.93</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4677.02</b> M <sub>calc.</sub> = <b>4863.33</b> M <sub>calc.</sub> = <b>5125.14</b>	[M+3H] <sup>3+</sup> = 1339.10 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1600.80 [M+3H] <sup>3+</sup> = x [M+3H] <sup>3+</sup> = 1404.49 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1469.93 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1535.37 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1491.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1644.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = x [M+3H] <sup>3+</sup> = 1687.40 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1775.30 [M+3H] <sup>3+</sup> = x [M+3H] <sup>3+</sup> = 1556.90 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1622.20 [M+3H] <sup>3+</sup> = 1709.06





	<b>RAFT(8)<sub>1</sub>(9)<sub>1</sub>(10)<sub>2</sub></b> <b>RAFT(7)<sub>1</sub>(8)<sub>1</sub>(9)<sub>1</sub>(10)<sub>1</sub></b>			$t_R = ?$ $t_R = 12.50$ minutes	$M_{\text{calc.}} = 5019.85$ $M_{\text{calc.}} = 4561.92$	$[M+3H]^{3+} = \times$ $M+3H]^{3+} = 1521.80$
--	---	--	--	------------------------------------	--	--

- **Couplage combinatoire chimiosélectif Sucres/RAFT:**

Pour les sucres x-z les solutions stocks sont faites dans l'eau. Les proportions utilisés sont les suivantes:

Sucres	Nb d'éq. /RAFT	masse (mg)	Volume RAFT (µL)	Volume Acide acétique
GalNAc-α-ONH2	12	2.4	100	10% Volume total
Man-α-ONH2	12	1.97	100	10% Volume total
Fuc-α-ONH2	12	1.81	100	10% Volume total
Lac-β-ONH2	12	3.6	100	10% Volume total
GalNAc-α-ONH2	6	1.2	100	10% Volume total
Man-α-ONH2	6	0.99	100	10% Volume total
Fuc-α-ONH2	6	0.91	100	10% Volume total
Lac-β-ONH2	6	1.8	100	10% Volume total
GalNAc-α-ONH2	4	0.8	100	10% Volume total
Man-α-ONH2	4	0.66	100	10% Volume total
Fuc-α-ONH2	4	0.61	100	10% Volume total
Lac-β-ONH2	4	1.2	100	10% Volume total
GalNAc-α-ONH2	3	0.597	100	10% Volume total
Man-α-ONH2	3	0.493	100	10% Volume total
Fuc-α-ONH2	3	0.453	100	10% Volume total
Lac-β-ONH2	3	0.903	100	10% Volume total

Les sous bibliothèques et bibliothèques sont analysées par CLHP et spectrométrie de masse (MALDI).

- Sous-bibliothèques à 1 sucre:

Sucres	Conjugué RAFT/Sucre	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-40% de B en 30 min)	SM (MALDI)	
					M calculée	M trouvée
Man 29	<b>RAFT(Man)<sub>4</sub></b>	1 heure	89%	$t_R = 18.72$ minutes	<b>C<sub>76</sub>H<sub>122</sub>N<sub>18</sub>O<sub>38</sub>Na</b> $M_{\text{calc.}} = 1917.81$	$[M+Na]^+ = 1918.09$
Fuc 58	<b>RAFT(Fuc)<sub>4</sub></b>	1 heure	83%	$t_R = 21.02$ minutes	<b>C<sub>76</sub>H<sub>122</sub>N<sub>18</sub>O<sub>34</sub>Na</b> $M_{\text{calc.}} = 1853.83$	$[M+Na]^+ = 1853.83$
GalNAc 40	<b>RAFT(GalNAc)<sub>4</sub></b>	1 heure	78%	$t_R = 18.55$ minutes	<b>C<sub>84</sub>H<sub>135</sub>N<sub>22</sub>O<sub>38</sub></b> $M_{\text{calc.}} = 2059.93$	$[M+H]^+ = 2061.12$
Lac 46	<b>RAFT(Lac)<sub>4</sub></b>	1 heure	88%	$t_R = 16.91$ minutes	<b>C<sub>100</sub>H<sub>162</sub>N<sub>18</sub>O<sub>58</sub>Na</b> $M_{\text{calc.}} = 2566.02$	$[M+Na]^+ = 2566.96$

- Sous bibliothèques à 2 sucres:

Sucres	Conjugué RAFT/Sucres	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-40% de B en 30 min)	SM (MALDI)	
					M calculée	M trouvée
Man+Fuc 29 + 58	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Fuc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>4</sub>	1 heure	84%	t <sub>R</sub> = 18.71 minutes t <sub>R</sub> = 19.28 minutes t <sub>R</sub> = 19.85 minutes t <sub>R</sub> = 20.43 minutes t <sub>R</sub> = 21.02 minutes	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1901.82 M <sub>calc.</sub> = 1885.82 M <sub>calc.</sub> = 1869.82 M <sub>calc.</sub> = 1853.83	[M+H] <sup>+</sup> = 1917.99 [M+H] <sup>+</sup> = 1901.98 [M+H] <sup>+</sup> = 1885.94 [M+H] <sup>+</sup> = 1869.94 [M+H] <sup>+</sup> = 1853.96
Man+Lac 29 + 46	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub>	1 heure	54%	t <sub>R</sub> = 18.70 minutes t <sub>R</sub> = 18.25 minutes t <sub>R</sub> = 17.80 minutes t <sub>R</sub> = 17.35 minutes t <sub>R</sub> = 16.91 minutes	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 2079.86 M <sub>calc.</sub> = 2241.91 M <sub>calc.</sub> = 2403.96 M <sub>calc.</sub> = 2566.02	[M+H] <sup>+</sup> = 1917.87 [M+H] <sup>+</sup> = 2080.04 [M+H] <sup>+</sup> = 2242.13 [M+H] <sup>+</sup> = 2404.22 [M+H] <sup>+</sup> = 2566.27
Man+GalNAc 29 + 40	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (GalNAc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>3</sub> RAFT(GalNAc) <sub>4</sub>	1 heure	74%	Pic large	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1936.86 M <sub>calc.</sub> = 1977.88 M <sub>calc.</sub> = 2018.90 M <sub>calc.</sub> = 2059.93	[M+H] <sup>+</sup> = 1918.23 [M+H] <sup>+</sup> = 1938.17 [M+H] <sup>+</sup> = 1979.20 [M+H] <sup>+</sup> = 2020.25 [M+H] <sup>+</sup> = 2060.26
Fuc+Lac 46 + 58	RAFT(Fuc) <sub>4</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub>	1 heure	82%	t <sub>R</sub> = 21.02 minutes t <sub>R</sub> = 19.98 minutes t <sub>R</sub> = 18.95 minutes t <sub>R</sub> = 17.93 minutes t <sub>R</sub> = 16.91 minutes	M <sub>calc.</sub> = 1831.83 M <sub>calc.</sub> = 2009.89 M <sub>calc.</sub> = 2187.94 M <sub>calc.</sub> = 2366.99 M <sub>calc.</sub> = 2566.02	[M+H] <sup>3+</sup> = 1832.02 [M+H] <sup>3+</sup> = 2010.11 [M+H] <sup>3+</sup> = 2189.20 [M+H] <sup>3+</sup> = 2367.28 [M+H] <sup>3+</sup> = ∞
Fuc+GalNAc 40 + 58	RAFT(Fuc) <sub>4</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (GalNAc) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>3</sub> RAFT(GalNAc) <sub>4</sub>	1 heure	62%	t <sub>R</sub> = 21.02 minutes t <sub>R</sub> = 20.39 minutes t <sub>R</sub> = 19.78 minutes t <sub>R</sub> = 19.16 minutes t <sub>R</sub> = 18.55 minutes	M <sub>calc.</sub> = 1853.83 M <sub>calc.</sub> = 1888.87 M <sub>calc.</sub> = 1945.89 M <sub>calc.</sub> = 2002.91 M <sub>calc.</sub> = 2059.93	[M+H] <sup>+</sup> = ∞ [M+H] <sup>+</sup> = 1888.88 [M+H] <sup>+</sup> = 1945.92 [M+H] <sup>+</sup> = 2003.91 [M+H] <sup>+</sup> = ∞
GalNAc+Lac 40 + 46	RAFT(GalNAc) <sub>4</sub> RAFT(GalNAc) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(GalNAc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(GalNAc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub>	1 heure	81%	t <sub>R</sub> = 18.55 minutes t <sub>R</sub> = 18.14 minutes t <sub>R</sub> = 17.73 minutes t <sub>R</sub> = 17.31 minutes t <sub>R</sub> = 16.91 minutes	M <sub>calc.</sub> = 2081.91 M <sub>calc.</sub> = 2180.95 M <sub>calc.</sub> = 2301.99 M <sub>calc.</sub> = 2423.02 M <sub>calc.</sub> = 2566.02	[M+H] <sup>+</sup> = 2082.98 [M+H] <sup>+</sup> = 2182 [M+H] <sup>+</sup> = 2303.07 [M+H] <sup>+</sup> = 2424.01 [M+H] <sup>+</sup> = ∞

- Sous-bibliothèques à 3 sucres:

Sucres	Conjugué RAFT/peptide	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-40% de B en 30 min)	SM (MALDI)	
					M calculée	M trouvée
Man+Fuc+Lac 29 + 46 + 58	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Fuc) <sub>4</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Fuc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>2</sub>	1 heure	77%	t <sub>R</sub> = 18.71 minutes t <sub>R</sub> = 21.02 minutes t <sub>R</sub> = 16.91 minutes t <sub>R</sub> = 19.28 minutes t <sub>R</sub> = 19.85 minutes t <sub>R</sub> = 20.43 minutes t <sub>R</sub> = 18.25 minutes t <sub>R</sub> = 17.80 minutes t <sub>R</sub> = 17.35 minutes t <sub>R</sub> = 19.98 minutes t <sub>R</sub> = 18.95 minutes t <sub>R</sub> = 17.93 minutes t <sub>R</sub> = ? t <sub>R</sub> = ? t <sub>R</sub> = ?	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1853.83 M <sub>calc.</sub> = 2566.02 M <sub>calc.</sub> = 1901.82 M <sub>calc.</sub> = 1885.82 M <sub>calc.</sub> = 1869.82 M <sub>calc.</sub> = 2079.86 M <sub>calc.</sub> = 2241.91 M <sub>calc.</sub> = 2403.96 M <sub>calc.</sub> = 2009.89 M <sub>calc.</sub> = 2187.94 M <sub>calc.</sub> = 2366.99 M <sub>calc.</sub> = 2064.07 M <sub>calc.</sub> = 2047.89 M <sub>calc.</sub> = 2225.84	Détectés sous forme de [M+H-sucres] ou [M+H-2sucres] ou [M+Na-sucres] ou [M+Na-2sucres]  [M+Na] <sup>+</sup> = 2063.99 [M+Na] <sup>+</sup> = 2047.97 [M+Na] <sup>+</sup> = 2226.06

<b>Man+Fuc+GalNac</b> 29 + 40 + 58	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Fuc) <sub>4</sub> RAFT(GalNac) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Fuc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>2</sub>	1 heure	73%	5 pics 18.50 – 21.09 min	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1853.83 M <sub>calc.</sub> = 2081.91 M <sub>calc.</sub> = 1901.82 M <sub>calc.</sub> = 1885.82 M <sub>calc.</sub> = 1869.82 M <sub>calc.</sub> = 1936.86 M <sub>calc.</sub> = 1977.88 M <sub>calc.</sub> = 2018.90 M <sub>calc.</sub> = 1888.87 M <sub>calc.</sub> = 1945.89 M <sub>calc.</sub> = 2002.91 M <sub>calc.</sub> = 1942.97 M <sub>calc.</sub> = 1926.89 M <sub>calc.</sub> = 1984.56	Détectés sous forme de [M+H-sucré] ou [M+H-2sucres] ou [M+Na-sucré] ou [M+Na-2sucres] [M+Na] <sup>+</sup> = 1942.91 [M+Na] <sup>+</sup> = 1927.91 [M+Na] <sup>+</sup> = 1984.93
<b>Man+Lac+GalNac</b> 29 + 40 + 46	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub> RAFT(GalNac) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>3</sub> RAFT(GalNac) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(GalNac) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(GalNac) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>2</sub>	1 heure	84%	5 pics 16.90 – 18.97 min	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 2566.02 M <sub>calc.</sub> = 2081.91 M <sub>calc.</sub> = 2079.86 M <sub>calc.</sub> = 2241.91 M <sub>calc.</sub> = 2403.96 M <sub>calc.</sub> = 1936.86 M <sub>calc.</sub> = 1977.88 M <sub>calc.</sub> = 2018.90 M <sub>calc.</sub> = 2180.95 M <sub>calc.</sub> = 2301.99 M <sub>calc.</sub> = 2423.02 M <sub>calc.</sub> = 2099.24 M <sub>calc.</sub> = 2261.45 M <sub>calc.</sub> = 1962.23	Détectés sous forme de [M+H-sucré] ou [M+H-2sucres] ou [M+Na-sucré] ou [M+Na-2sucres] [M+H] <sup>+</sup> = 2099.58 [M+H] <sup>+</sup> = × [M+Na] <sup>+</sup> = 1962.66
<b>Fuc+Lac+GalNac</b> 40 + 46 + 58	RAFT(Fuc) <sub>4</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub> RAFT(GalNac) <sub>4</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>3</sub> RAFT(GalNac) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(GalNac) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(GalNac) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>2</sub>	1 heure	68%	9 pics 16.80 – 21.10 min	M <sub>calc.</sub> = 1853.83 M <sub>calc.</sub> = 2566.02 M <sub>calc.</sub> = 2081.91 M <sub>calc.</sub> = 2009.89 M <sub>calc.</sub> = 2187.94 M <sub>calc.</sub> = 2366.99 M <sub>calc.</sub> = 1888.87 M <sub>calc.</sub> = 1945.89 M <sub>calc.</sub> = 2002.91 M <sub>calc.</sub> = 2180.95 M <sub>calc.</sub> = 2301.99 M <sub>calc.</sub> = 2423.02 M <sub>calc.</sub> = 2067.35 M <sub>calc.</sub> = 2244.77 M <sub>calc.</sub> = 2124.52	Détectés sous forme de [M+H-sucré] ou [M+H-2sucres] ou [M+Na-sucré] ou [M+Na-2sucres] [M+H] <sup>+</sup> = 2067.95 [M+H] <sup>+</sup> = 2244.87 [M+H] <sup>+</sup> = 2124.93

- Bibliothèque à 4 sucres:

Peptide	Conjugué RAFT/peptide	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-40% de B en 30 min)	SM (MALDI)	
					M calculée	M trouvée
<b>Man+Fuc+Lac+GalNac</b> 29 + 40 + 46 + 58	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Fuc) <sub>4</sub> RAFT(Lac) <sub>4</sub> RAFT(GalNac) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Fuc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (GalNac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (GalNac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (GalNac) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Fuc) <sub>3</sub> (GalNac) <sub>1</sub>	2 heures	82%	9 pics 16.80 – 21.10 min	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1853.83 M <sub>calc.</sub> = 2566.02 M <sub>calc.</sub> = 2081.91 M <sub>calc.</sub> = 1901.82 M <sub>calc.</sub> = 1885.82 M <sub>calc.</sub> = 1869.82 M <sub>calc.</sub> = 2079.86 M <sub>calc.</sub> = 2241.91 M <sub>calc.</sub> = 2403.96 M <sub>calc.</sub> = 1936.86 M <sub>calc.</sub> = 1977.88 M <sub>calc.</sub> = 2018.90 M <sub>calc.</sub> = 2009.89 M <sub>calc.</sub> = 2187.94 M <sub>calc.</sub> = 2366.99 M <sub>calc.</sub> = 1888.87	Détectés sous forme de [M+H-sucré] ou [M+H-2sucres] ou [M+Na-sucré] ou [M+Na-2sucres]

	RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (GalNAc) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>3</sub> RAFT(GalNAc) <sub>3</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(GalNAc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(GalNAc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>3</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>2</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>2</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>2</sub> RAFT(Fuc) <sub>2</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>2</sub> (GalNAc) <sub>1</sub> RAFT(Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Fuc) <sub>1</sub> (Lac) <sub>1</sub> (GalNAc) <sub>1</sub>				M <sub>calc.</sub> = 1945.89 M <sub>calc.</sub> = 2002.91 M <sub>calc.</sub> = 2180.95 M <sub>calc.</sub> = 2301.99 M <sub>calc.</sub> = 2423.02 M <sub>calc.</sub> = 2064.07 M <sub>calc.</sub> = 2047.89 M <sub>calc.</sub> = 2225.84 M <sub>calc.</sub> = 1942.97 M <sub>calc.</sub> = 1926.89 M <sub>calc.</sub> = 1984.56 M <sub>calc.</sub> = 2099.24 M <sub>calc.</sub> = 2261.45 M <sub>calc.</sub> = 1962.23 M <sub>calc.</sub> = 2067.35 M <sub>calc.</sub> = 2244.77 M <sub>calc.</sub> = 2124.52 M <sub>calc.</sub> = 2083.17	Détectés sous forme de [M+H-sucre] ou [M+H-2sucres] ou [M+Na-sucre] ou [M+Na-2sucres]       [M+H] <sup>+</sup> = 2083.74
--	---	--	--	--	--	---

• **Couplage combinatoire chimiosélectif Sucres-acides aminés/RAFT**

Sous-bibliothèques à 2 sucres/acides aminés

Les sucres et les acides aminés sont dissous dans l'eau à 10 mg/mL. Les couplages sont réalisés selon le tableau suivant:

Acides aminés/sucres	Nb d'équivalents/RAFT	masse (mg)	Volume RAFT (µL)	Volume Acide acétique
Man-α-OH <sub>2</sub>	6	0.99	100	10% Volume total
Tyr-OH <sub>2</sub>	6	1.35	100	10% Volume total
Phe-OH <sub>2</sub>	6	1.27	100	10% Volume total
Ile-OH <sub>2</sub>	6	1.10	100	10% Volume total
Lys-OH <sub>2</sub>	60	11.77	100	10% Volume total
Asp-OH <sub>2</sub>	6	1.11	100	10% Volume total
m(RAFT) = 1mg donc n=0,842µmol				

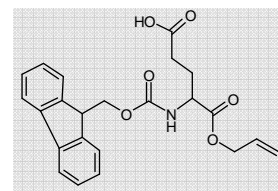
Peptide	Conjugué RAFT/Sucres	Temps réact.	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-100% (A) ou 5-60% (B) de B en 15 min)	SM (MALDI)	
					M calculée	M trouvée
Man+Tyr 29 + 20	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Tyr) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Tyr) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Tyr) <sub>3</sub> RAFT(Tyr) <sub>4</sub>	1 heure	65%	t <sub>R</sub> = 6.21 minutes (B) t <sub>R</sub> = 7.75 minutes (B) t <sub>R</sub> = 9.29 minutes (B) t <sub>R</sub> = 10.83 minutes (B) t <sub>R</sub> = 12.37 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1968.85 M <sub>calc.</sub> = 2041.88 M <sub>calc.</sub> = 2124.91 M <sub>calc.</sub> = 2188.91	[M+H] <sup>+</sup> = 1917.61 [M+H] <sup>+</sup> = 1404.49 [M+H] <sup>+</sup> = 2042.92 [M+H] <sup>+</sup> = 2115.95 [M+H] <sup>+</sup> = 2189.09
Man+Phe 29 + 21	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Phe) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Phe) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Phe) <sub>3</sub> RAFT(Phe) <sub>4</sub>	1 heure	54%	t <sub>R</sub> = 5.38 minutes t <sub>R</sub> = 6.70 minutes t <sub>R</sub> = 8.01 minutes t <sub>R</sub> = 9.33 minutes t <sub>R</sub> = 10.64 minutes	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1953.68 M <sub>calc.</sub> = 2010.28 M <sub>calc.</sub> = 2067.61 M <sub>calc.</sub> = 2124.18	[M+H] <sup>+</sup> = × [M+H] <sup>+</sup> = × [M+H] <sup>+</sup> = 2011.02 [M+H] <sup>+</sup> = 2067.96 [M+H] <sup>+</sup> = ×
Man+Ile 29 + 22	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Ile) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Ile) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Ile) <sub>3</sub> RAFT(Ile) <sub>4</sub>	1 heure	58%	t <sub>R</sub> = 5.38 minutes t <sub>R</sub> = 6.62 minutes t <sub>R</sub> = 7.86 minutes t <sub>R</sub> = 9.10 minutes t <sub>R</sub> = 10.34 minutes	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1918.79 M <sub>calc.</sub> = 1941.51 M <sub>calc.</sub> = 1965.16 M <sub>calc.</sub> = 1987.14	[M+H] <sup>+</sup> = 1918.08 [M+H] <sup>+</sup> = 1919.07 [M+H] <sup>+</sup> = 1941.83 [M+H] <sup>+</sup> = 1964.91 [M+H] <sup>+</sup> = 1986.94
Man+Lys 29 + 18	RAFT(Man) <sub>4</sub> RAFT(Man) <sub>3</sub> (Lys) <sub>1</sub> RAFT(Man) <sub>2</sub> (Lys) <sub>2</sub> RAFT(Man) <sub>1</sub> (Lys) <sub>3</sub> RAFT(Lys) <sub>4</sub>	1 heure	42%	t <sub>R</sub> = 6.21 minutes (B) t <sub>R</sub> = 6.58 minutes (B) t <sub>R</sub> = 6.95 minutes (B) t <sub>R</sub> = 7.32 minutes (B) t <sub>R</sub> = 7.69 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = 1917.81 M <sub>calc.</sub> = 1972.18 M <sub>calc.</sub> = 4195.75 M <sub>calc.</sub> = 2010.28 M <sub>calc.</sub> = 2048.12	[M+H] <sup>+</sup> = × [M+H] <sup>+</sup> = 1972.48 [M+H] <sup>+</sup> = 1399.30 [M+H] <sup>+</sup> = 2010.51 [M+H] <sup>+</sup> = 2048.61

Man+Asp 29 + 19	RAFT(Man) <sub>4</sub>	1 heure	52%	t <sub>R</sub> = 6.21 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = <b>1917.81</b>	[M+H] <sup>+</sup> = 1917.96
	RAFT(Man) <sub>3</sub> (Asp) <sub>1</sub>			t <sub>R</sub> = 6.55 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = <b>1921.07</b>	[M+H] <sup>+</sup> = 1920.96
	RAFT(Man) <sub>2</sub> (Asp) <sub>2</sub>			t <sub>R</sub> = 6.91 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = <b>1946.34</b>	[M+H] <sup>+</sup> = 1946.94
	RAFT(Man) <sub>1</sub> (Asp) <sub>3</sub>			t <sub>R</sub> = 7.22 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = <b>1970.14</b>	[M+H] <sup>+</sup> = 1970.94
	RAFT(Asp) <sub>4</sub>			t <sub>R</sub> = 7.60 minutes (B)	M <sub>calc.</sub> = <b>1995.21</b>	[M+H] <sup>+</sup> = 1995.97

## Bibliothèque de molécules par split and mix:

- **Fmoc-Dglu-OAll : 62**

Du Fmoc-Dglu(OtBu)OH **60** (2.89 g ; 6.8 mmol) est dissous dans un mélange méthanol 20 / eau 1 (20 mL). Une solution de carbonate de césium 3M est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH8 puis le mélange est évaporé à sec. Après avoir repris le résidu avec de l'acétonitrile (100 mL), du bromure d'allyle (4 mL ; 6.5 éq.) est ajouté et la solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant une nuit. On observe l'apparition d'un précipité blanc correspondant à la formation de bromure de césium au cours de la réaction. La solution est concentrée puis de l'acétate d'éthyle (100 mL) est ajouté. La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis à nouveau avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide. Le résidu huileux obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane puis dichlorométhane 9 / acétate d'éthyle 1). La totalité du produit **61** obtenu est ensuite dissous dans une solution DCM/TFA (1/1)(20 mL) et le mélange est laissé sous agitation à température ambiante. Après une heure, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu huileux est précipité dans un mélange éther / pentane pour donner 1.59 g d'un solide blanc correspondant au produit **62**.



→ **Rendement** : 57%.

→ **CLHP** : t<sub>R</sub> = 10.3 min (C<sub>18</sub>, 214 et 299 nm, 5-100% de B en 15 minutes).

→ **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO) : δ ppm 12.1 (s large, 1H, CO<sub>2</sub>H), 7.89-7.33 (m, 8H, Har.), 7.71 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>NH,CHα</sub> = 7.5 Hz, NH), 5.98-5.82 (m, 1H, -CH=), 5.30 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>-CH2</sub> = 1.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>-CH2',-CH=</sub> = 17.1 Hz, =CH<sub>2</sub>''), 5.20 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>-CH2'',-CH=</sub> = 10.5 Hz, =CH<sub>2</sub>''), 4.58 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>O-CH2,-CH=</sub> = 5.1 Hz, O-CH<sub>2</sub>-), 4.32-4.21 (m, 3H, CHFmoc, CH<sub>2</sub>Fmoc), 4.16-4.08 (m, 1H, CHα), 2.32 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>CHβ,CHγ</sub> = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>γ), 2.06-1.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β).

→ **RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, DMSO) : δ ppm 174.0 (HO-C=O), 172.1 (C=O), 156.5(C=O), 144.2 (Car.), 144.1 (Car.), 141.1 (Car.), 132.7 (-CH=), 128.0 (CHar.), 127.4 (CHar.), 125.6 (CHar.), 120.5 (CHar.), 118.1 (CH<sub>2</sub>=), 66.1 (CH<sub>2</sub>Fmoc), 65.2 (O-CH<sub>2</sub>-), 53.5 (CHα), 47.0 (CHFmoc), 30.3 (CH<sub>2</sub>γ), 26.3 (CH<sub>2</sub>β).

- **Split and mix** :

La résine est reprise dans un mélange DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/1) et agité puis séparée en 5 portions égales à l'aide d'une seringue. Les couplages sont réalisés deux fois selon les conditions

classiques. Après chaque couplage on réalise une acétylation des sites qui n'auraient pas réagi en ajoutant sur la résine une solution d'anhydride acétique/pyridine/DMF (3/2/1) et en laissant sous agitation pendant 30 minutes. L'efficacité des couplages et de l'acétylation est vérifiée par les tests de TNBS et Kaiser.

- **Criblage des bibliothèques sur la CK2:** réalisé par l'équipe de C. Cochet au CEA de Grenoble.
- **Criblage des bibliothèques sur la vitamine B12:** réalisé par l'équipe de J.-L. Reymond
- **Analyse des billes:** réalisé par l'équipe de J.-L. Reymond

Les billes relevant une activité sont traitées par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 6M pendant 22 heures. La composition en acides aminés est déterminé par CLHP analytique après couplage avec l'isothiocyanate de phényle (PITC).

- **Détermination des séquences actives:** réalisé par l'équipe de J.-L. Reymond

La séquence des peptides actifs est déterminés par le profil CLHP obtenus après le traitement des billes en comparant avec les references des dérivés-PITC.

- **Resynthèse des peptides actifs sur l'aquocobalamine :**

Les peptides actifs issus de L1 sont tous synthétisés selon le **protocole A2** sur 150 mg de résine Rink amide MBHA<sup>®</sup> (taux de substitution 0,69 mmol/g). La déprotection finale du Fmoc est réalisé selon le **protocole B** et celle du groupement Alloc de la chaîne latérale de lysine selon le **protocole E**. La moitié de la résine est directement traitée selon le **protocole G** pour donner le peptide linéaire qui servira également au tests. Le peptide **65''** est lui au préalable acétylé par action d'une solution d'anhydride acétique/pyridine/DMF (3/2/1) pendant 45 minutes sur la résine. Le reste de la résine permettra d'obtenir les peptides cycliques par ajout d'une solution de 3 équivalents de PyBOP et de 2 à 4 équivalents de DIEA dans du DMF (10 mL/g) pendant 45 minutes. Le procédé sera répété deux fois. Enfin la résine et les groupes protecteurs sont éliminés à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5) ou TFA/TIS/H<sub>2</sub>O/EDT (90/2.5/2.5/5) selon si le peptide contient des cysteines ou non

pendant 2 heures. Après évaporation le peptide est précipité dans l'Et<sub>2</sub>O puis purifié par CLHP semi-préparative.

Peptide	Séquence	Rendement	CLHP (C <sub>18</sub> , 214 et 250 nm, 5-100% de B en 30 min)	SM (ESI)	
				M calculée	M trouvée
63'	H <sub>2</sub> N-H-I-T-P-G-E-D-A-P-q	59%	t <sub>R</sub> = 5.07 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> O <sub>17</sub> M <sub>calc.</sub> = 1064.51	[M+H] <sup>+</sup> = 1064.51
63	c[H-I-T-P-G-E-D-A-P-q]	47%	t <sub>R</sub> = 5.51 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub> M <sub>calc.</sub> = 1046.50	[M+H] <sup>+</sup> = 1046.55
64'	H <sub>2</sub> N-H-D-E-P-G-I-A-T-P-q	79%	t <sub>R</sub> = 5.47 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> O <sub>17</sub> M <sub>calc.</sub> = 1064.51	[M+H] <sup>+</sup> = 1064.53
64	c[H-D-E-P-G-I-A-T-P-q]	88%	t <sub>R</sub> = 5.57 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> O <sub>17</sub> M <sub>calc.</sub> = 1064.51	[M+H] <sup>+</sup> = 1046.56
65'	H <sub>2</sub> N-V-D-E-P-G-E-D-C-P-q	33%	t <sub>R</sub> = 5.10 minutes	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>20</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1088.43	[M+H] <sup>+</sup> = 1088.55
65	c[V-D-E-P-G-E-D-C-P-q]	87%	t <sub>R</sub> = 5.29 minutes	C <sub>44</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>19</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1070.42	[M+H] <sup>+</sup> = 1070.49
66'	H <sub>2</sub> N-H-C-T-P-G-E-L-A-P-q	39%	t <sub>R</sub> = 5.65 minutes	C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> O <sub>15</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1052.50	[M+H] <sup>+</sup> = 1052.44
66	c[H-C-T-P-G-E-L-A-P-q]	35%	t <sub>R</sub> = 6.03 minutes	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1034.48	[M+H] <sup>+</sup> = 1034.45
67'	H <sub>2</sub> N-V-I-E-P-G-E-D-C-P-q	82%	t <sub>R</sub> = 5.62 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>18</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1086.49	[M+H] <sup>+</sup> = 1086.35
67	c[V-I-E-P-G-E-D-C-P-q]	90%	t <sub>R</sub> = 5.84 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>17</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1068.48	[M+H] <sup>+</sup> = 1068.56
68'	H <sub>2</sub> N-V-I-D-P-G-E-D-A-P-q	81%	t <sub>R</sub> = 5.37 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>11</sub> O <sub>18</sub> M <sub>calc.</sub> = 1054.51	[M+H] <sup>+</sup> = 1054.50
68	c[V-I-D-P-G-E-D-A-P-q]	76%	t <sub>R</sub> = 5.58 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> N <sub>11</sub> O <sub>17</sub> M <sub>calc.</sub> = 1036.50	[M+H] <sup>+</sup> = 1036.56
65''	Ac-V-D-E-P-G-E-D-C-P-q	20%	t <sub>R</sub> = 5.43 minutes	C <sub>46</sub> H <sub>68</sub> N <sub>11</sub> O <sub>21</sub> S M <sub>calc.</sub> = 1130.43	[M+H] <sup>+</sup> = 1130.40

#### 4. Tests et criblages biologiques :

- **Tests sur colonne d'affinité :**

Les bibliothèques et sous-bibliothèques sont mis en solution dans l'eau à 1mM pour former les solutions stocks. Les colonnes d'affinités sont réalisées à l'aide d'un gel d'agarose fonctionnalisé par ConA à un taux de 20 mg/ml fourni par Aldrich. 200μL de ce gel est déposé dans une mini colonne en plastique qui se termine par un fritté. Le gel est



préalablement équilibré par 6 ajouts de 500  $\mu$ L de tampon d'équilibration Tris 20 mM (NaCl à 0.15M, MnCl<sub>2</sub> à 1 mM, CaCl<sub>2</sub> à 1 mM, pH 7.4). Une solution de 500 $\mu$ L du mélange à 5 $\mu$ M dans le tampon est déposée sur la colonne. La colonne est ensuite lavée 5 fois avec le tampon d'équilibration puis 500  $\mu$ L du tampon d'élution Tris 20mM contenant du mannose à 0.5M sont déposés afin de décrocher les molécules fixées sur la colonne. Le taux de fixation des molécules se fait en comparant les profils CLHP des sous bibliothèques avant passage sur la colonne, après passage sur la colonne.

- **Tests de Biacore :**

Les tests SPR se déroulent sur un appareil Biacore T100. Nous utilisons un tampon HEPES 20mM à pH 7.2 (0.05% Twenn 20, MnCl<sub>2</sub> à 1 mM, CaCl<sub>2</sub> à 1 mM) La ConA et la PNA sont accrochées sur une chips CM-5 par lien amine après activation des liaisons acide du dextran au N-hydroxyOSuimide et EDC. Les tests se déroulent sur une surface diluée en protéine et on fait varier les concentrations d'analyte de 1 $\mu$ M à 400 $\mu$ M. Toutes les données sont traitées avec le logiciel Biacore T100 évaluation.

- **Titration de l'aquocobalamine (HO-Cbl):**

Les spectres UV ont été effectués sur un appareil Cary 400 scan de chez Varian<sup>®</sup> en utilisant des cuvettes en quartz avec septum de 1,3 mL, 10mm de chez Hellma<sup>®</sup>. Les solutions sont introduites à l'intérieur des cuvettes à l'aide de micro-seringues Hamilton.

Pour réaliser la titration de l'aquocobalamine, on mesure le spectre d'absorbance du complexe HO-CBI/peptide de 250 à 700nm. Lorsque l'ajout de peptide n'a plus aucun effet sur l'absorbance à 350 nM, la titration est terminée. Les expériences se déroulent dans du tampon HEPES 20mM à pH 7. La titration de l'HO-Cbl avec les peptides est réalisée en prélevant 10  $\mu$ L d'HO-CBI (solution stock dans le tampon à 2.5 mM préalablement dégazée) que l'on ajoute à 990  $\mu$ L de tampon, puis 5  $\mu$ L d'une solution de peptides sont ajoutés. Ces 5  $\mu$ L correspondent respectivement à une concentration de 5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M pour les peptides contenant une cystéine (solution stock dans le tampon à 1.25 mM préalablement dégazée) et une histidine (solution stock dans le tampon à 6.25 mM préalablement dégazée). L'analyse des données se fait par le logiciel « Origin ».

---

# *Annexes*

---



## Annexes

### 1. Calculs théoriques du nombre de combinaison :

#### 1.1 Nombre de possibilité à 4 ligands $\neq$ sur 4 sites :

Il y a 1 seule manière d'avoir les 4 ligands différents sur les 4 sites :  $C_4^4 = \frac{4!}{4!(4-4)!} = \frac{24}{24} = 1$

Pour chaque site il y a 4 possibilités. Si on place le premier ligand sur un site, pour les 3 sites

restants il y a 3 ligands possibles. On a donc :  $A_4^4 = \frac{4!}{(4-4)!} = \frac{24}{0!} = 24$

⇒ Nombre de possibilités à 4 ligands  $\neq$  attribués sur chacun des 4 sites =  $C_4^4 \times A_4^4 = 24$

- Cas où les sites sont 2 à 2 équivalents ( $1 \leftrightarrow 3$  et  $2 \leftrightarrow 4$ , symétrie C2) :

Pour chaque ligands  $\rightarrow$  2 possibilités (1 ou 3 et 2 ou 4), on a donc  $A_4^2 = \frac{4!}{(4-2)!} = \frac{24}{2} = 12$

⇒ Nombre de possibilités à 4 ligands  $\neq$  attribués =  $C_4^4 \times A_4^2 = 12$

#### 1.2. Nombre de possibilités à 3 ligands $\neq$ sur 4 sites (2 sites portent le même ligand):

Il existe 4 combinaisons à 3 ligands parmi 4 ligands possibles ( $C_4^3 = 4$ ). En adressant 2

ligands identiques sur 2 sites il y a 6 possibilités  $A_3^2 = \frac{3!}{(3-2)!} = \frac{6}{0!} = 6$  ; ensuite il faut placer les

2 autres ligands sur 4 sites possibles  $C_4^2 = 6$ , ce qui donne 36 (6x6) arrangements possibles.

⇒ Nombre de possibilités à 3 ligands  $\neq$  attribués sur 4 sites =  $C_4^2 \times A_3^2 \times C_4^3 = 144$

- Cas où les adresses sont 2 à 2 équivalente ( $1 \leftrightarrow 4$  et  $2 \leftrightarrow 3$ , symétrie C2) :

On adresse 2 ligands identiques sur deux sites, on a donc seulement 6 possibilités

( $A_3^2 = \frac{3!}{(3-2)!} = \frac{6}{0!} = 6$ ). Par contre la symétrie divise en 2 le nombre de combinaisons de

placer les 2 autres ligands ( $(C_4^2)/2 = 3$ ).

⇒ Nombre de possibilités à 3 ligands  $\neq$  attribués sur 4 sites =  $(C_4^2/2) \times A_3^2 \times C_4^3 = 72$

### 1.3. Nombre de possibilités à 2 ligands $\neq$ sur 4 sites (3 sites portent le même ligand et 2 sites portent le même ligand):

Il existe 6 combinaisons à 2 ligands ( $C_4^2 = 6$ ).

✓ Si on adresse 3 ligands sur 3 sites (4 possibilités) on a  $C_4^3 = \frac{24}{6} = 4$  (correspond à la combinaison de 3 ligands sur 4 sites possibles) et  $A_2^1 = \frac{2!}{(2-1)!} = \frac{2}{1!} = 2$  (correspond à l'arrangement du ligand restant sur 2 sites possibles) ; ce qui donne :  $4 \times 2 = 8$  possibilités.

✓ Si on adresse 2 ligands sur 2 sites alors les 2 autres étant identiques ils sont obligatoirement fixés également.  $C_4^2 = \frac{24}{4} = 6$  (correspond aux combinaisons de 2 ligands sur 4 sites) et

$A_2^2 = \frac{2!}{(2-2)!} = \frac{2}{2!} = 1$  (correspond à l'arrangement des 2 autres ligands sur les 2 sites restants) ;

Ce qui donne au total  $6 \times 1 = 6$  possibilités.

Donc on a au final  $8 + 6 = 14$  arrangements possibles auxquels il faut multiplier le nombre de combinaison de 2 ligands pris parmi 4 ( $C_4^2 = 6$ ).

➡ Nombre de possibilités à 2 ligands  $\neq$  attribués sur 4 sites :  $14 \times C_4^2 = 84$

- Cas où les sites sont 2 à 2 équivalente ( $1 \leftrightarrow 4$  et  $2 \leftrightarrow 3$ , symétrie C2) :

✓ Si on adresse 3 ligands sur 3 sites on a  $C_4^3 = \frac{24}{6} = 4$  (correspond à la combinaison de 3 ligands sur 4 sites possibles)

✓ Si on adresse 2 ligands sur 2 sites alors les 2 autres étant identiques ils sont obligatoirement fixés également. Ce qui nous donne seulement 4 possibilités

Donc on a au final  $4 + 4 = 8$  arrangements possibles auxquels il faut multiplier le nombre de combinaison de 2 ligands pris parmi 4 ( $C_4^2 = 6$ ).

➡ Nombre de possibilités à 2 ligands  $\neq$  attribués sur 4 sites :  $8 \times C_4^2 = 48$

### 1.4. Nombre de possibilités à 4 ligands identiques sur 4 sites:

Il y a n arrangements (1 par ligands). Ce qui donne  $A_4^1 = \frac{24}{6} = 4$  possibilités.

➡ Nombre de possibilités à 1 ligands attribués sur 4 sites :  $1 \times A_4^1 = 4$ .

## *Publications*

- V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy. «  $\alpha$  and  $\beta$  L-Fucopyranosyl oxyamines: key intermediates for the preparation of fucose-containing glycoconjugates by oxime ligation. » *Carbohydrate Res.* **2007**, *342*, 894-900.
- V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy. « Ethoxyethylidene protecting group prevents N overacylation in aminooxy peptide synthesis. » *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11952-11958.
- B. Laudet, C. Barette, V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy, A. Metz, R. Prudent, A. Deshiere, O. Dideberg, O. Filhol, C. Cochet. « Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. » *Biochem. J.* 2007, sous-presse.

## *Communications orales*

- Vincent Duléry, Olivier Renaudet, Pascal Dumy. « Heteroglycocluster combinatorial synthesis onto cyclopeptidic scaffold. » Journée thématique GFPP « du Glycosynthon à la Glycoprotéine: un défi pour Chimiste et Biologiste. », Orléans, 27-28 septembre 2007.
- Vincent Duléry, Olivier Renaudet, Pascal Dumy. « Combinatorial assembly of biomolecules onto cyclodecapeptidic template and biological screening. » COST Workshop-D34-00732, Parme (Italie), 4-6 octobre 2006.
- Vincent Duléry, Olivier Renaudet, Pascal Dumy. « Assemblage combinatoire de surfaces de reconnaissance pour l'étude et l'exploitation des interactions biologiques. » 11<sup>ème</sup> Rencontres de Chimie Organique Biologique (RECOB), Aussois, 26-30 mars 2006.

## *Posters*

➤ Olivier Renaudet, Vincent Duléry, Pascal Dumy. « Chemoselective synthesis and biological applications of glycoclusters assembled on cyclopeptide scaffold. » Forum Nouvelles Technologies pour la Santé, Grenoble, 30-31 octobre 2007

➤ Vincent Duléry, Olivier Renaudet, Pascal Dumy. « Randomized Combinatorial Libraries of Heteroglycoclusters. » COST Workshop-D34-00732, Berne (Suisse), 19-21 octobre 2007.

➤ Sophie Plé, Vincent Duléry, Olivier Renaudet, Cécile Jamin, Pascal Dumy. « Assemblage combinatoire de surfaces de reconnaissances pour l'étude et l'exploitation des interactions biologiques. » Journée Société Française de Chimie (SFC), Le bourget du Lac, 16 juin 2005.

# $\alpha$ and $\beta$ L-Fucopyranosyl oxyamines: key intermediates for the preparation of fucose-containing glycoconjugates by oxime ligation

Vincent Duléry, Olivier Renaudet,\* Christian Philouze and Pascal Dumy\*

LEDSS, UMR-CNRS 5616 and ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble Cedex 9, France

Received 15 November 2006; received in revised form 15 January 2007; accepted 4 February 2007

Available online 12 February 2007

**Abstract**—We report herein the synthesis of new  $\alpha$  and  $\beta$  aminoxyylated L-fucopyranosyl derivatives for the preparation of glycoclusters through oxime ligation. The glycosylation reaction between activated triacetylated L-fucopyranosyl fluoride and *N*-hydroxyphthalimide was carried out in the presence of boron trifluoride–diethyl etherate and the stereochemical outcome of glycosylation was compared in dichloromethane, acetonitrile or tetrahydrofuran. Interestingly, an unexpected  $\alpha$  and  $\beta$  anomer ratio was obtained in spite of the presence of an acetate participating group at the carbon 2, particularly the 1,2-*cis* glycosylation was largely favoured in acetonitrile. The resulting  $\alpha$  and  $\beta$  *N*-oxyphthalimido fucopyranosyl derivatives were finally deprotected with methylhydrazine to obtain the corresponding free aminoxyylated fucopyranosyls. The structure of single-crystal  $\alpha$  anomer **12** was analysed by X-ray diffraction.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Aminoxyylated fucopyranosyl; Glycosylation; Anomeric mixture; Oxime ligation; Crystal structure; Glycocluster

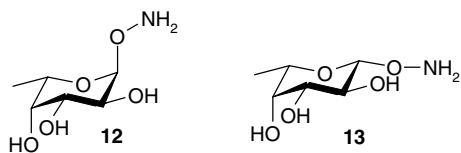
## 1. Introduction

As part of our programme to develop new chemical tools for glycomics,<sup>1–3</sup> we focussed recently our synthetic efforts on the L-fucose motif which is a relevant part of ligands involved in a wide range of biological processes.<sup>4,5</sup> In mammals, fucose-containing glycans play a crucial role in the recognition events related to fertilisation, development or adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells, which is mediated by interactions between selectin and glycans at the initial state of inflammation processes.<sup>6</sup> Moreover, fucosylated glycoconjugates are involved in many diseases, going from pathogen infections<sup>7</sup> to cancers.<sup>8</sup> For example, it has recently been shown that the chronic colonisation of the lung with *Pseudomonas aeruginosa*, which is responsible for infections in patients affected with cystic fibrosis, starts with the adhesion of the bacterium to the host cells through fucose-binding PA-IIL lectin present at its surface.<sup>9</sup>

Inhibiting these host/pathogen recognition processes, which occur mostly through multivalent interactions, might efficiently prevent infections. For this purpose, the synthesis of glycoclusters appears as one of the most promising approaches to discover new active and selective therapeutics.<sup>10</sup> Among the very large panel of reported synthetic methods, chemoselective ligations have emerged as an attractive strategy for the assembly of biomolecules.<sup>11,12</sup> In our laboratory, we have chosen chemoselective oxime bond formation to prepare cyclic decapeptides exhibiting clusters of carbohydrates in solution as well as on solid support for diagnostic or therapeutic applications.<sup>1–3</sup> Our oxime-based strategy relies on the convergent assembly of aminoxyylated carbohydrates onto templates presenting aldehyde functions. Herein, we report the synthesis of new fucopyranosyl derivatives **12** and **13** bearing at the anomeric centre both  $\alpha$  and  $\beta$  aminoxy functionalities that are essential for the evaluation of the influence of anomeric configurations on recognition (Fig. 1). These derivatives represent key intermediates for further assembly onto scaffolds to form clusters and evaluation

\* Corresponding authors. Fax: +33 476 514 946; e-mail addresses: [olivier.renaudet@ujf-grenoble.fr](mailto:olivier.renaudet@ujf-grenoble.fr); [pascal.dumy@ujf-grenoble.fr](mailto:pascal.dumy@ujf-grenoble.fr)





**Figure 1.** Structure of aminoxyylated  $\alpha$  and  $\beta$  L-fucopyranosyl **12** and **13**.

of the resulting fucose-containing conjugate as anti-infective agents.

## 2. Results and discussion

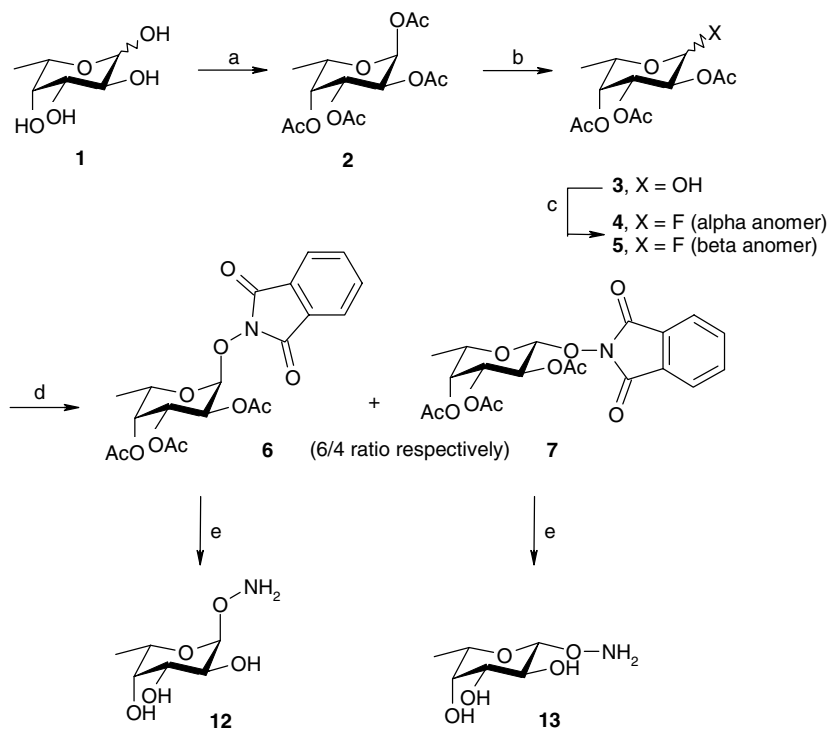
### 2.1. Synthesis

We reported previously a general method for the preparation of aminoxyylated carbohydrate-based ligands<sup>13</sup> and cancer-related antigens<sup>14</sup> using a glycosylation reaction between glycosyl fluoride donors and *N*-hydroxyphthalimide as the key step. This efficient synthetic strategy has been applied to the L-fucose series to prepare the corresponding aminoxyylated derivatives (Scheme 1). The commercial L-fucopyranose **1** was first protected with acetates in the presence of pyridine and acetic anhydride. The peracetylated compound **2** was then deprotected regioselectively at the anomeric position by treatment with a solution of ethylenediamine/

acetic acid (1/1)<sup>15</sup> in tetrahydrofuran to obtain **3** in 86% yield. A fluoride was introduced as an anomeric leaving group to the triacetylated fucopyranose **3** by using diethylaminosulfur trifluoride (DAST) in THF.<sup>16</sup> The fluorinated compound has been obtained as an  $\alpha/\beta$  anomer mixture (1.2/1, 72% yield).

When the glycosylation reaction was carried out between crude anomer mixture **4/5** and *N*-hydroxyphthalimide in the presence of triethylamine and boron trifluoride–diethyl etherate ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ )<sup>17</sup> as promoter in dichloromethane (Scheme 1), both the  $\alpha$  and  $\beta$  fucopyranosyl-*N*-oxyphthalimide anomers **6** and **7** were formed and purified by silica gel chromatography and recrystallisation. They were characterised by using electrospray ionisation mass spectrometry and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and 2D (GCOSY and GHMQC) NMR experiments. The determination of the coupling constant ( $J$ ) between protons H-1 and H-2 was in good agreement with the anomer configuration of **6** ( $J_{1,2} = 4.0$  Hz) and **7** ( $J_{1,2} = 8.1$  Hz). Interestingly, this glycosylation gave a poor anomeric ratio in favour of the  $\alpha$  anomer ( $\alpha/\beta = 1.5/1$ ). While it is well established that the presence of an ester protecting group at C-2 enables the preferential formation of a 1,2-*trans* glycosidic linkage due to the assistance of a neighbouring participating group,<sup>18–20</sup> this result indicates a minor influence of the acetate on the stereoselectivity of this reaction.

Several publications report unexpected stereochemical outcomes for glycosylation. For example, it has been



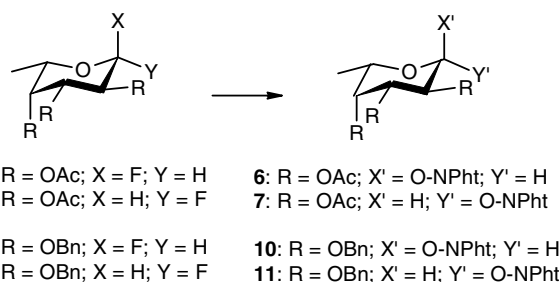
**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine, 6 h, 97%; (b) ethylenediamine, AcOH, THF, 12 h, 86%; (c) diethylaminosulfur trifluoride, THF, 1 h, 72% ( $\alpha/\beta$  anomer, 1.2/1); (d) *N*-hydroxyphthalimide,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1 h, 77%; (e)  $\text{MeHNHNH}_2$ , EtOH, 12 h, 51%.

suggested that the nature of a protecting group at C-4 may affect the selectivity of glycosylation through a long-range participation, particularly in the galactose and fucose series bearing a benzyl non-participating group at C-2.<sup>21–23</sup> More recently, it was reported that  $\alpha$  glycosides can be formed from imidate or thioglycosyl donors despite the presence of acetate at C-2 being capable of neighbouring group participation.<sup>24,25</sup> These intriguing studies prompted us to investigate which factors could influence the stereoselectivity of the glycosylation of L-fucose with *N*-hydroxyphthalimide, in particular the effect of the configuration of the fluoride donor, of the nature of protecting groups and of the reaction solvent. Thus, we first performed the reaction between pure  $\alpha$  and  $\beta$  fucopyranosyl fluoride donors **4** and **5** in dry dichloromethane, acetonitrile or tetrahydrofuran. Each fluoride anomer was thus separated by silica gel chromatography with hexane/diethyl ether as eluent to obtain 39% and 33% of pure anomers **4** and **5**, respectively. To evaluate the role of the protecting group at C-2, we then prepared and isolated fucopyranosyl fluorides **8** and **9** protected with benzyl groups as donors.<sup>26</sup> Glycosylations were achieved under the same experimental conditions except the solvent as shown in Table 1. The course of the reactions was followed using reverse phase analytical HPLC and the anomer composition in the crude mixture was determined by measuring the integration of the corresponding

peaks. In polar aprotic solvent such as acetonitrile, the glycosylation from acetate protected fluoride donors **4** or **5** gave a large unexpected excess of  $\alpha$  anomer **6** ( $\alpha/\beta = 4.8/1$  from **4**;  $\alpha/\beta = 3.7/1$  from **5**) in both cases. This stereoselectivity might be explained by a S<sub>N</sub>1-type pathway in which the resulting oxonium cation is stabilised by solvation with acetonitrile. This may favour the formation of  $\alpha$  glycosyl **6** due to the anomeric effect and decreases the influence of anchimeric assistance, which should have ensured the preferential formation of 1,2-trans  $\beta$  linkage by the nucleophilic attack of the *N*-hydroxyphthalimide at the  $\alpha$  face. On the other hand, no trace of  $\beta$  glycosylation was observed when the carbon 2 of donors **8** and **9** is protected with a benzyl non-participating group, thus affording the more thermodynamically stable  $\alpha$  anomer **10**.

The outcome of glycosylation was comparable in dichloromethane from benzylated fluoride donors **8** and **9** ( $\alpha$  anomer only) for the same reason. However, when performed from acetate protected donors, the glycosylation from  $\alpha$  fluoride **4** leads preferentially to  $\alpha$  glycosyl **6** as the major product ( $\alpha/\beta = 2.2/1$ ), whereas a poor anomeric ratio was observed from **5**. Indeed, it can be postulated that in this apolar solvent the stabilisation of the oxonium cation is lower than in polar solvent. The formation of  $\beta$  glycosyl induced by the neighbouring group participation is thus higher than in acetonitrile, with a slight preference for  $\beta$  anomer **7**

**Table 1.** Glycosylation reaction with pure fucopyranosyl fluoride and *N*-hydroxyphthalimide



Solvent	Fluoride donor			Glycosylation product (yield %)
	Compound	Anomer	Protection at C-2	
Acetonitrile	<b>4</b>	Alpha	Acetate	$\alpha/\beta$ Anomers <b>6/7</b> = 4.8/1 (81)
	<b>5</b>	Beta	Acetate	$\alpha/\beta$ Anomers <b>6/7</b> = 3.7/1 (86)
	<b>8</b>	Alpha	Benzyl	$\alpha/\beta$ Anomer <b>10</b> only (68)
	<b>9</b>	Beta	Benzyl	$\alpha/\beta$ Anomer <b>10</b> only (73)
Dichloromethane	<b>4</b>	Alpha	Acetate	$\alpha/\beta$ Anomers <b>6/7</b> = 2.2/1 (88)
	<b>5</b>	Beta	Acetate	$\alpha/\beta$ Anomers <b>6/7</b> = 0.7/1 (81)
	<b>8</b>	Alpha	Benzyl	$\alpha/\beta$ Anomer <b>10</b> only (60)
	<b>9</b>	Beta	Benzyl	$\alpha/\beta$ Anomer <b>10</b> only (66)
Tetrahydrofuran	<b>4</b>	Alpha	Acetate	$\alpha/\beta$ Anomers <b>6/7</b> = 0.4/1 (80)
	<b>5</b>	Beta	Acetate	$\alpha/\beta$ Anomers <b>6/7</b> = 0.4/1 (75)
	<b>8</b>	Alpha	Benzyl	$\alpha/\beta$ Anomers <b>10/11</b> = 19/1 (50)
	<b>9</b>	Beta	Benzyl	$\alpha/\beta$ Anomers <b>10/11</b> = 16/1 (63)

All reactions have been performed at room temperature in anhydrous solvent in the presence of *N*-hydroxyphthalimide (1 equiv), BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (4 equiv) and triethylamine (1 equiv) for 2 h. Yields, which are unoptimised, and stereochemistry have been determined by peak integration of HPLC profile of crude mixtures at 214 nm after 1 h.

when the donor displays a 1,2-trans linkage ( $\alpha/\beta = 0.7/1$  from **5**).

In contrast, a significant difference in reactivity was observed in tetrahydrofuran. First, the expected  $\beta$  linkage was commonly formed ( $\alpha/\beta = 0.4/1$ ) whatever the anomer configuration of the acetate protected fluoride donors **4** or **5** was. More surprisingly, while the formation of 1,2-*cis* glycoside due to the anomeric effect was predominantly favoured, traces of  $\beta$  anomer **11** were obtained from donors **8** and **9** protected with a benzyl non-participating group. This outcome could be explained by the participation of the solvent in glycosylation, forming an axial oxonium cation which helps the formation of the 1,2-trans linkage ( $\alpha/\beta = 19/1$  or  $16/1$  from **8** and **9**).

The final deprotection was performed by the treatment of **6** and **7** with methylhydrazine in ethanol overnight (Scheme 1). Pure aminosylated  $\alpha$  fucose **12** was obtained as single crystals after evaporation and crystallisation in ethanol, whereas  $\beta$  anomer **13** was isolated after silica gel chromatography with dichloromethane/ethanol (1/1) as eluent. The measurement of coupling constant between H-1 and H-2 of **12** and **13** ( $J_{1,2}$  3.4 Hz,  $J_{1,2}$  8.2 Hz, respectively) was in good agreement with the expected configurations of the anomeric centre.

## 2.2. X-ray crystallographic analysis

Standard results on the structure determination are reported in Table 2.<sup>27</sup> The crystal structure of *O*- $\alpha$ -L-fuco-

pyranosyl oxyamine **12** (Fig. 2) was solved from a pseudo-orthorhombic twin crystal. The real system is a monoclinic crystal with  $\beta \sim 90^\circ$  twinned via a twofold rotation about **a**.<sup>28</sup> The asymmetric cell contains two independent molecules and four water molecules. The secondary structure comes out of a very strong net of hydrogen bonds (22 on the all) between the water molecules and **12** (16 bonds) or between two molecules **12** (5 bonds). One hydrogen bond is intramolecular along O(9)–H(9)–O(10). Compound **12** displays the expected distances and angles.<sup>29</sup> The Cremer and Pople parameters<sup>30</sup> calculated for the ring  $Q = 0.575(2)$  Å,  $\sigma_2 = 115.8(3)^\circ$ ,  $\theta = 175.3(3)^\circ$  show that the ring is very close to a perfect chair conformation. The absolute configuration which was deduced from the L-configuration of the starting material **1** confirms the stereochemistry of the anomeric centre of compound **12**.

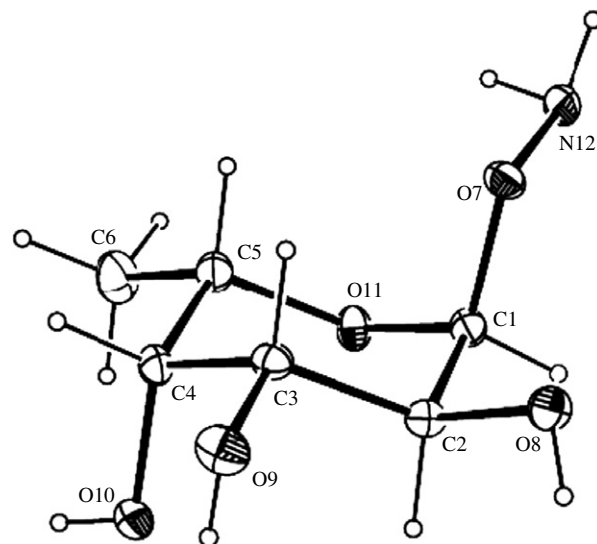
## 3. Experimental

### 3.1. General

All chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France) and were used without further purification. Thin layer chromatographies were performed on 0.2 mm silica 60 coated aluminium foils with F-254 indicator (Merck) and detected under UV light and developed with aqueous sulfuric acid (100 mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O 15%) containing molybdic acid (2 g) and cerium(IV) sulfate hydrate (1 g). Preparative column chromatographies were done using silica gel (Merck 60, 200–63  $\mu$ m). Melting points were measured on an Electrothermal Serie IA9100 apparatus. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C

**Table 2.** Crystal data and structure refinement for compound **12**

Empiric formula	[C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> ] <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Formula weight (g/mol)	430.41
Temperature (K)	150(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system	Twined monoclinic
Space group	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	4.808(5)
<i>b</i> (Å)	9.828(5)
<i>c</i> (Å)	20.726(5)
$\beta$ (°)	90.00(5)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	979.4(12)
<i>Z</i>	2
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (Mg/m <sup>3</sup> )	1.46
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	0.133
<i>F</i> (000)	464
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	0.34 × 0.18 × 0.10
Crystal colour	Colourless
$\theta$ Range for data collection (°)	2.07–33.01
Index ranges	–7 ≤ <i>h</i> ≤ 6 –14 ≤ <i>k</i> ≤ 14 –31 ≤ <i>l</i> ≤ 31
Reflections collected/unique	15,094/6605
Refinement method	Against <i>F</i> <sup>2</sup>
Data/restrain/parameters	6412/0/316
Final <i>R</i> indices	0.0303
<i>R</i> Indices (all data)	0.0901
Goodness-of-fit on <i>F</i> <sup>2</sup>	0.76



**Figure 2.** ORTEP drawing of compound **12**.

NMR spectra were recorded on Bruker AC300 spectrometers and chemical shifts ( $\delta$ ) were reported in parts per million (ppm). Spectra were referenced to the residual proton solvent peaks. Proton and carbon assignments were obtained from GCOSY and GHMQC experiments. The  $\alpha$ -anomeric configuration of all carbohydrates was established by determination of the coupling constant ( $J$ ) between H-1 and H-2. HRMS analyses were provided by the mass spectrometry service of the Department of Chemistry and Biochemistry, University of Berne, by electron spray ionisation (ES-MS) on an Applied Biosystems/Sciex QSTAR Pulsar in the positive mode. Reverse phase HPLC analyses were performed on Waters equipment using  $C_{18}$  columns. The analytical HPLC (Nucleosil 120 Å 3  $\mu$ m  $C_{18}$  particles, 30  $\times$  4.6 mm<sup>2</sup>) was operated at 1.3 mL/min and the preparative HPLC (Delta-Pak 300 Å 15  $\mu$ m  $C_{18}$  particles, 200  $\times$  25 mm<sup>2</sup>) at 22 mL/min flow with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient (buffer A: 0.09% CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H in water; buffer B: 0.09% CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H in 90% acetonitrile).

### 3.2. X-ray diffraction experiments

X-ray diffraction data for *O*- $\alpha$ -L-fucopyranosyl oxyamine **12** were recorded on a Bruker AXS-Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer using a graphite monochromator ( $\lambda$  (Mo K $\alpha$ ): 0.71073 Å). The temperature of the crystal was maintained at the selected value 150(2) K using a 700 series Cryostream cooling device. The data were corrected for Lorentz and polarisation effects. Then the data were processed using WINGX.<sup>31</sup> The structure was solved by direct method with the use of the SIR92 software<sup>32</sup> and refined against  $F^2$  by full-matrix least-squares techniques using SHELXL97.<sup>33</sup> The twin structure was solved within the  $P12_11$  space group using the following twin law:

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$$

with two domains and a BASF of 0.44896 displaying a ratio of almost 45–55% for the two domains. The final refinement involved an anisotropic model for all nonhydrogen atoms. The hydrogen atoms were set geometrically when ridding a carbon atom or for the hydroxyl groups. Hydrogen atoms from the water molecules or from the amino groups were set using the difference Fourier map. All of them were recalculated before the last refinement cycle.

### 3.3. (1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl)- $\alpha$ -L-fucopyranose **2**

L-Fucopyranose **1** (5 g, 30.5 mmol) was dissolved in a solution of acetic anhydride and pyridine (1/2,

150 mL) and stirred at room temperature overnight. The solution was concentrated and taken up with ethyl acetate. The organic layer was washed successively four times with citric acid, then water, dried over sodium sulfate and evaporated to obtain **2** (9.7 g, 96%) as a white powder after precipitation from pentane; mp 90–92 °C;  $R_f$  0.6 (ethyl acetate); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.36 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.7 Hz, H-1), 5.36–5.34 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.29 (br q, 1H,  $J_{5,CH_3}$  6.5 Hz, H-5), 2.20 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.18 (d, 3H,  $J_{5,CH_3}$  6.5 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.9 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.3 (C=O<sub>Ac</sub>), 169.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 90.3 (C-1), 70.9 (C-2, C-3 or C-4), 68.2 (C-2, C-3 or C-4), 67.7 (C-5), 66.9 (C-2, C-3 or C-4), 21.3 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (COCH<sub>3</sub>), 21.0 (COCH<sub>3</sub>), 20.9 (COCH<sub>3</sub>), 16.3 (CH<sub>3</sub>); ESIMS:  $m/z$  calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 355.10; found: 354.92.

### 3.4. (2,3,4-Tri-*O*-acetyl)- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranosyl fluoride **4 and 5**

Acetic acid (2.35 mL, 41.0 mmol) was added in a solution of THF (400 mL) containing ethylenediamine (2.35 mL, 35.1 mmol). Compound **2** (9.7 g, 29.3 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature overnight. After addition of water, the organic layer was taken up with ethyl acetate and washed successively with hydrochloric acid solution, aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over sodium sulfate and evaporated to obtain **3** (7.3 g, 86%) as a colourless oil. Compound **3** (1.98 g, 6.8 mmol) was dissolved in dry THF (10 mL) and the solution was cooled at –30 °C. Diethylaminosulfurtrifluoride (1.08 mL, 8.2 mmol) was then added and the solution stirred at room temperature for 30 min. After quenching the reaction with methanol (2 mL) at –30 °C, the solution was concentrated and taken up with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed successively with aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, then water, dried over sodium sulfate and evaporated to obtain a colourless oil corresponding to the fucopyranosyl fluoride as anomer mixture. Each anomer was separated by silica gel chromatography (hexane/ether 4/6) to give pure  $\alpha$  **4** and  $\beta$  **5** fluorides.  $\alpha$  Anomer **4**: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> –85.5 (*c* 2.5, CHCl<sub>3</sub>);  $R_f$  0.65 (hexane/ether, 4/6); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.87 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  2.7 Hz,  $J_{1,F}$  53.7 Hz, H-1), 5.51–5.46 (m, 2H, H-3, H-4), 5.29 (dddd, 1H,  $J_{2,4}$  1.2 Hz,  $J_{1,2}$  2.7 Hz,  $J_{2,3}$  11.7 Hz,  $J_{2,F}$  23.6 Hz, H-2), 4.46 (br q, 1H,  $J_{5,CH_3}$  6.5 Hz, H-5), 2.13 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.23 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.29 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.31 (d, 3H,  $J_{5,CH_3}$  6.5 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.7 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.6 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.3 (C=O<sub>Ac</sub>), 104.9 (d,  $J_{C-1,F}$  226 Hz, C-1), 70.7 (C-4), 67.8 (d,  $J_{C-2,F}$  30 Hz, C-2), 67.7 (d,  $J_{C-2,F}$  9 Hz, C-3), 65.6 (C-5), 20.9 (COCH<sub>3</sub>), 21.0 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (COCH<sub>3</sub>), 18.2 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS:  $m/z$  calcd for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>FNa: 315.0856; found: 315.0849.  $\beta$  Anomer **5**: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> –48.1 (*c* 12.2,

CHCl<sub>3</sub>); *R*<sub>f</sub> 0.38 (hexane/ether, 4/6); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 5.21–5.13 (m, 2H, H-3, H-4), 5.03 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 7.2 Hz, *J*<sub>1,F</sub> 51 Hz, H-1), 4.95–4.91 (m, 1H, H-2), 3.81 (br q, 1H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.4 Hz, H-5), 1.88 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.17 (d, 3H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 170.8 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.4 (C=O<sub>Ac</sub>), 169.7 (C=O<sub>Ac</sub>), 107.5 (d, *J*<sub>C-1,F</sub> 216 Hz, C-1), 70.8 (d, *J*<sub>C-2,F</sub> 45 Hz, C-2), 70.1 (C-4), 69.9 (C-5), 69.3 (C-3), 20.9 (COCH<sub>3</sub>), 21.0 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (COCH<sub>3</sub>), 16.2 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS: *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>FN<sub>a</sub>: 315.0856; found: 315.0846.

### 3.5. *O*-(2,3,6-Tri-*O*-acetyl)- $\alpha/\beta$ -L-fucopyranosyl-*N*-oxyphthalimide **6** and **7**

The following procedure is typical for each glycosylation. To a stirring solution of  $\alpha$  fluoride **4** (100 mg, 0.34 mmol), *N*-hydroxyphthalimide (55 mg, 0.34 mmol) and triethylamine (44  $\mu$ L, 0.34 mmol) in THF was added BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (47  $\mu$ L, 0.34 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 1 h. After completeness of the reaction, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was then added to the mixture and the organic layer was washed two times with 10% aqueous sodium hydrogenocarbonate, then water, dried under sodium sulfate and evaporated. A mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  anomers was obtained and each anomer was separated by flash chromatography (hexane/ether 4/6) to give pure compounds **6** and **7** (122 mg, 82%,  $\alpha/\beta = 1/2.3$ ).  $\alpha$  Anomer **6**: mp 92–94 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> –157.1 (*c* 3.1, CHCl<sub>3</sub>); *R*<sub>f</sub> 0.34 (hexane–ether, 4/6); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.87–7.76 (m, 4H, H<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 5.59 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3.9 Hz, H-1), 5.55 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3.3 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11.2 Hz, H-3), 5.45 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 1.1 Hz, *J*<sub>3,4</sub> 3.3 Hz, H-4), 5.27 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3.9 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11.2 Hz, H-2), 5.09 (br q, 1H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.3 Hz, H-5), 2.23 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.21 (d, 3H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 171.2 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.8 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.2 (C=O<sub>Ac</sub>), 163.5 (C=O<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 135.1 (CH<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 129.2 (C<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 124.1 (CH<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 102.5 (C-1), 71.3 (C-4), 67.6 (C-2 or C-3), 67.5 (C-2 or C-3), 67.4 (C-5), 21.2 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (COCH<sub>3</sub>), 20.9 (COCH<sub>3</sub>), 16.2 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS: *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>10</sub>Na: 458.1063; found: 458.1058.  $\beta$  Anomer **7**: mp 92–94 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +7.6 (*c* 2.6, CHCl<sub>3</sub>); *R*<sub>f</sub> 0.17 (hexane/ether, 4/6); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.90–7.77 (m, 4H, H<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 5.46 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.3 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10.3 Hz, H-2), 5.29–5.27 (m, 1H, H-4), 5.12 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3.4 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10.3 Hz, H-3), 4.99 (q, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.3 Hz, H-1), 3.84 (br q, 1H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.3 Hz, H-5), 2.24 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.23 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.27 (d, 3H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 171.2 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.5 (C=O<sub>Ac</sub>), 170.3 (C=O<sub>Ac</sub>), 163.1 (C=O<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 135.1 (CH<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 129.2 (C<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 124.2 (CH<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 106.8 (C-1), 71.4 (C-3), 70.6 (C-5), 70.1 (C-4), 67.5 (C-2), 21.2 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (COCH<sub>3</sub>), 20.9 (COCH<sub>3</sub>), 16.4 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS: *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>10</sub>Na: 458.1063; found: 458.1079.

### 3.6. *O*-(2,3,6-Tri-*O*-benzyl)- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-*N*-oxyphthalimide **10**

Compound **10** was obtained from **8** following the procedure described for **6** after purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate, 7/3); mp 53–55 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> –64.1 (*c* 4.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.86–7.73 (m, 4H, H<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 7.56–7.29 (m, 15, H<sub>Bn</sub>), 5.62 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3.8 Hz, H-1), 5.11–4.66 (m, 7H, H-5, 3 × CH<sub>2</sub>), 4.26 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3.9 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10.3 Hz, H-2), 4.13 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2.7 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10.3 Hz, H-3), 3.78 (br d, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 2.7 Hz, H-4), 1.14 (d, 3H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 163.5 (C=O<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 138.8 (C<sub>Bn</sub>), 138.4 (C<sub>Bn</sub>), 138 (C<sub>Bn</sub>), 134.4 (CH<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 129.0 (C<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 128.4 (CH<sub>Bn</sub>), 128.4 (CH<sub>Bn</sub>), 128.3 (CH<sub>Bn</sub>), 128.2 (CH<sub>Bn</sub>), 127.7 (CH<sub>Bn</sub>), 127.6 (CH<sub>Bn</sub>), 127.5 (CH<sub>Bn</sub>), 127.5 (CH<sub>Bn</sub>), 123.5 (CH<sub>Ph<sub>t</sub></sub>), 102.7 (C-1), 78.5 (C-3), 77.8 (C-4), 75.3 (C-2), 75.0 (CH<sub>2</sub>), 73.7 (CH<sub>2</sub>), 72.8 (CH<sub>2</sub>), 69.1 (C-5), 16.5 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS: *m/z* calcd for C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub>Na: 602.2154; found: 602.2162.

### 3.7. *O*- $\alpha$ -L-Fucopyranosyl oxyamine **12**

Compound **6** (286 mg, 0.66 mmol) was dissolved in a solution of ethanol/methylhydrazine (10 mL, 1/1) and stirred at room temperature overnight. After evaporation, the fully deprotected aminoxylated fucose was recrystallised in ethanol to give **12** as single crystals (50 mg, 51%); mp 147–150 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> –131.2 (*c* 11.0, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): δ 4.96 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3.4 Hz, H-1), 4.10 (br q, 1H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.5 Hz, H-5), 3.83–3.80 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 1.24 (d, 3H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): δ 102.2 (C-1), 72.2 (C-2, C-3 or C-4), 69.9 (C-2, C-3 or C-4), 68.0 (C-2, C-3 or C-4), 67.1 (C-5), 15.7 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS: *m/z* calcd for C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>: 180.0871; found: 180.0866.

### 3.8. *O*- $\beta$ -L-Fucopyranosyl oxyamine **13**

Compound **13** was obtained from **7** following the procedure described for **12** after purification by flash chromatography (eluent: dichloromethane/ethanol, 7/3); mp 172–174 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +2.8 (*c* 10.3, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): δ 4.50 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.2 Hz, H-1), 3.81 (br q, 1H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.4 Hz, H-5), 3.77–3.75 (m, 1H, H-4), 3.67 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3.4 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 9.6 Hz, H-3), 3.51 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.2 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 9.6 Hz, H-2), 1.28 (d, 3H, *J*<sub>5,CH<sub>3</sub></sub> 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): δ 105.9 (C-1), 73.4 (C-3), 71.7 (C-4), 71.2 (C-5), 69.5 (C-2), 15.7 (CH<sub>3</sub>); HR-ESIMS: *m/z* calcd for C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>: 180.0871; found: 180.0875.

### Acknowledgements

This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Centre National

pour la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Joseph Fourier (UJF) and COST D34. We also acknowledge the Ministère de la Recherche for ACI-2003 'Molécules et Cibles Thérapeutiques' and for Grant No. 15432-2004 to V.D. We also thank Professor Juju Garcia for performing NMR analysis of fluoride compound **4**, University of Berne for the HR-MS analysis, Professor Isabelle Gautier-Luneau and Dr. Olivier Perez for their help for X-ray analysis.

### References

1. Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243–245.
2. Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2628–2636.
3. Renaudet, O.; Dumy, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3619–3622.
4. Staudacher, E.; Altmann, F.; Wilson, I. B. H.; März, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 216–236.
5. Becker, D. J.; Lowe, J. B. *Glycobiology* **2003**, *13*, 41R–53R.
6. Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833–862.
7. Ilver, D.; Arnqvist, A.; Ogren, J.; Frick, I.-M.; Kersulyte, D.; Incecik, E. T.; Berg, D. E.; Covacci, A.; Engstrand, L.; Thomas Borén, T. *Science* **1998**, *279*, 373–377.
8. Fukuda, M. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2237–2244.
9. Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Pérez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. *Nature Struct. Biol.* **2002**, *9*, 918–921.
10. *Synthetic Multivalent Molecules*; Choi, S.-K., Ed.; Wiley-Interscience: New Jersey, 2004.
11. Hang, H.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727–736.
12. Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59–81.
13. Renaudet, O.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7575–7578.
14. Renaudet, O.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 65–68.
15. Zhang, J.; Kovacs, P. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461–469.
16. Posner, G. J.; Haines, S. R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5–8.
17. Kunz, H.; Sager, W. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 283–287.
18. Wulff, G.; Röhle, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1974**, *13*, 157–216.
19. Toshima, K.; Tatsuta, K. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1502–1531.
20. Boons, G. J. *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 331–342.
21. Dejter-Juszynski, M.; Flowers, H. M. *Carbohydr. Res.* **1975**, *41*, 308–312.
22. Smid, P.; de Ruyter, G. A.; van der Marel, G. A.; Rombouts, F. M.; van Boom, J. H. *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 833–849.
23. Demchenko, A. V.; Rousson, E.; Boons, G.-J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6523–6526.
24. Yang, F.; He, H.; Du, Y.; Lü, M. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1165–1169.
25. Chen, L.; Kong, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3691–3695.
26. Schmid, U.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 494–501.
27. Crystallographic data (excluding structure factors) have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center as Supplementary Publication No. CCDC 624470. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK. [Fax: +44-1223-336-033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.]
28. Parsons, S. *Acta Crystallogr.* **2003**, *D59*, 1995–2003.
29. Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L.; Orpen, G.; Taylor, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1987**, S1–S19.
30. Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358.
31. Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 837–838.
32. Altomare, A.; Casciarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A. *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 343–350.
33. Sheldrick, G. M. *SHELXL97. Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen: Germany, 1997.



# Ethoxyethylidene protecting group prevents N-overacylation in aminoxy peptide synthesis

Vincent Duléry, Olivier Renaudet\* and Pascal Dumy\*

Département de Chimie Moléculaire, UMR-CNRS 5250 ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble Cedex 9, France

Received 24 July 2007; revised 29 August 2007; accepted 7 September 2007

Available online 12 September 2007

**Abstract**—We report herein an improved synthetic route for the preparation of homogenous aminoxy peptides suitable for oxime ligation. Aminoxyacetic acid (Aoa) was protected with 1-ethoxyethylidene group (Eei) then incorporated either using PyBOP or as *N*-hydroxysuccinimidyl ester at N-terminal end or at a lysine side chain into model peptides in solution and on solid support. Due to the Eei protecting group, these new reagents prevent the N-overacylation side reaction in comparison with Boc–Aoa derivatives. Subsequent deprotection under mild acidic conditions gave the corresponding pure aminooxylated peptides.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The synthesis of relevant functional macromolecules remains a crucial challenge for the investigation of biological processes. Among the large number of chemical ligation methods developed for this purpose,<sup>1–5</sup> chemoselective oxime bond formation represents one of the most efficient synthetic strategies. First developed by Rose for the preparation of homogenous artificial proteins,<sup>6</sup> the oxime-based strategy has found increasing applications in the last few years, going from the conjugation of peptides,<sup>7–9</sup> carbohydrates,<sup>10–12</sup> and oligonucleotides,<sup>13,14</sup> to the preparation of combinatorial libraries,<sup>15</sup> the on-chips immobilization of biomolecules,<sup>16–19</sup> or the chemical engineering.<sup>20,21</sup>

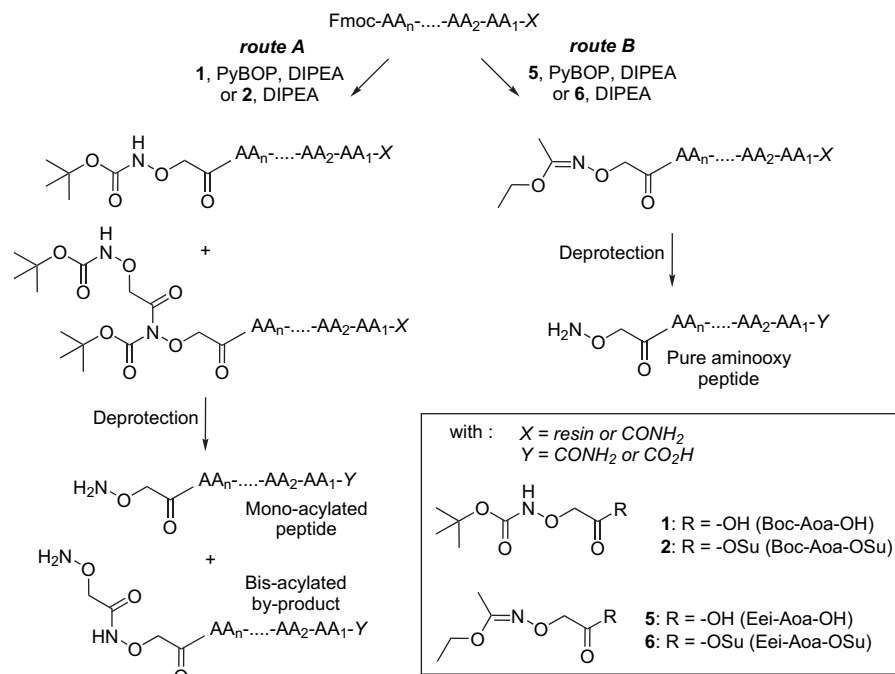
The oxime ligation requires the convergent preparation of each counterpart bearing either an aldehyde or a keto group and a super nucleophile aminoxy moiety, which react mutually with high chemoselectivity under mild acidic conditions to form a stable oxime linkage.<sup>22</sup> Whereas the methods to generate aldehydes in solid phase peptide synthesis (SPPS) are well documented,<sup>23</sup> and the incorporation of aminoxy at N-terminal end or at a lysine side chain of peptide remains tricky. Indeed, in most cases aminoxyacetic acid (Aoa) building block bearing a single carbamate protecting group (e.g., Boc or Alloc) is introduced as *N*-hydroxysuccinimidyl ester (OSu) or using in situ activation. However, the mono-protection of Aoa does not ensure the complete protection of the nitrogen, therefore providing *N*-overacylated Aoa–Aoa-peptide as an undesirable side product (Fig. 1, route A).<sup>24</sup> Several methods have been reported

to overcome this side reaction. For example, it was shown recently that N-overacylation can be minimized either by controlling the pH of the coupling reaction mixture containing Alloc–Aoa–OH and uronium coupling reagents or by using DCC, which does not require basic conditions for activation.<sup>25,26</sup> However, incomplete reaction or traces of bis-acylated side product can still be observed even when a large excess of reagents, repeated coupling reactions, or different reagents are used. Since mono-protection of Aoa is not satisfactory to prevent N-overacylation, an alternative strategy would consist in using protecting groups, which mask completely the nucleophilicity of the nitrogen atom such as phthaloyl protected Aoa.<sup>27</sup> The bis-protected derivative Boc<sub>2</sub>–Aoa–OH<sup>24</sup> constitutes also an attractive building block, but its instability under Fmoc deprotection conditions precludes, however, the use of this reagent in SPPS, except at the end of the peptide elongation.<sup>28</sup>

As part of our program related to the construction of synthetic multiepitopic vaccine candidates, which requires a highly clean chemistry to ensure the formation of well-defined molecules,<sup>29</sup> we focused recently our investigations in using a new reagent providing aminoxy peptides without trace of *N*-overacylated side products. We presumed that an Aoa derivative protected with 1-ethoxyethylidene group (Eei), which ensures the full protection of aminoxy function might assume this purpose (Fig. 1, route B). In this study, we thus investigated the incorporation of Aoa in different peptides by varying conditions and reagents both in solution and on solid support (Fig. 1). We prepared Aoa derivatives protected with a Boc or an Eei then we compared the outcome of acylation of different model peptides. The Aoa building block was either incorporated as active ester or by using in situ

\* Corresponding authors. Tel.: +33 04 76 51 48 63; fax: +33 04 76 51 49 46; e-mail: [pascal.dumy@ujf-grenoble.fr](mailto:pascal.dumy@ujf-grenoble.fr)





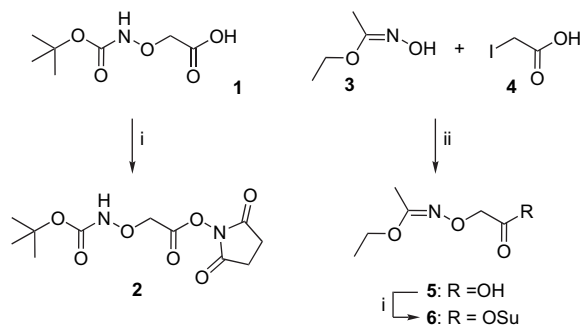
**Figure 1.** General strategy for the functionalization of peptides with aminoxy moiety in solution and on solid support using Boc protected Aoa (route A) or ethoxyethylidene (Eei) derivatives (route B).

activation to provide pendant and N-terminal aminoxy moiety on linear, bridged, and branched peptides.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Synthesis of Aoa derivatives

The commercially available aminoxyacetic acid **1** protected with a Boc was activated using *N*-hydroxysuccinimide and dicyclocarbodiimide (DCC) in a mixture of ethyl acetate and dioxane. After removal of DCU by filtration and precipitation, the active ester Boc-Aoa-OSu **2**<sup>30</sup> was obtained in 83% yield and was used without further purification for the coupling reaction with peptides (Scheme 1).



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (i) DCC, NHS, AcOEt/dioxane, 83% for **2**, 68% for **6**; (ii) NaOH 40%, 80 °C, 69%.

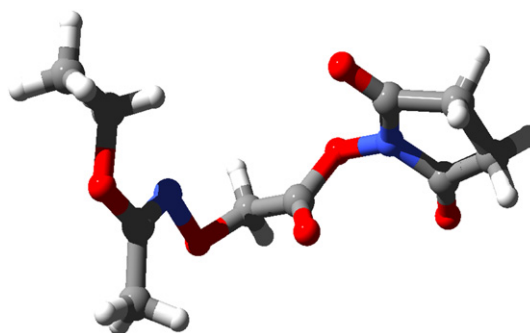
The synthesis of Aoa derivatives protected with 1-ethoxyethylidene starts with the condensation between ethyl *N*-hydroxyacetimidate **3** and iodoacetic acid **4** in sodium hydroxide, which provides *N*-(1-ethoxyethylidene)2-aminoxyacetic acid **5** in good yield.<sup>31</sup> The subsequent activation

was performed using the procedure described previously for **2**. The pure imidate Eei-Aoa-OSu **6** was obtained after flash chromatography and recrystallization as single crystals, which were analyzed by X-ray diffraction (Fig. 2).<sup>32</sup> Both reagents **5** and **6** were easily prepared in gram scale and were proved completely stable at room temperature and under storage.

### 2.2. Stability of Eei protecting group

We were next interested in studying the stability of the Eei protecting group in various conditions used in the Fmoc/Bu strategy (Table 1).

No deprotection was detected by RP-HPLC under the standard basic conditions used for coupling reaction and Fmoc removal, therefore confirming the compatibility of Eei-Aoa-OH or Eei-Aoa-OSu derivatives with peptide elongation. Interestingly, Eei was stable by treatment with mild acidic solution such as 1% of TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> or 50% aqueous solution of acetic acid, whereas the complete removal of Eei was observed in 3 or 1 h with aqueous solution of 1% or



**Figure 2.** X-ray structure of Eei-Aoa-OSu **6**.

**Table 1.** Stability of Eei protecting group under standard conditions of SPSS

Conditions	Deprotection <sup>b</sup>
DIPEA/DMF (pH 8) <sup>a</sup>	No deprotection after 45 min
Piperidine/DMF (1:4) <sup>a</sup>	No deprotection after 30 min
TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:99) <sup>a</sup>	No deprotection after 1 h
AcOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	No deprotection after 3 h
TFA/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (1:49.5:49.5)	Complete deprotection after 3 h
TFA/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (5:47.5:47.5)	Complete deprotection after 1 h
TFA/TIS/H <sub>2</sub> O (95:2.5:2.5)	Complete deprotection after 1 h
AcOH/TFE/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1:8) <sup>a</sup>	No deprotection after 2 h

<sup>a</sup> Dry solvents were used.

<sup>b</sup> The stability of Eei was followed by analytical RP-HPLC of reaction mixture.

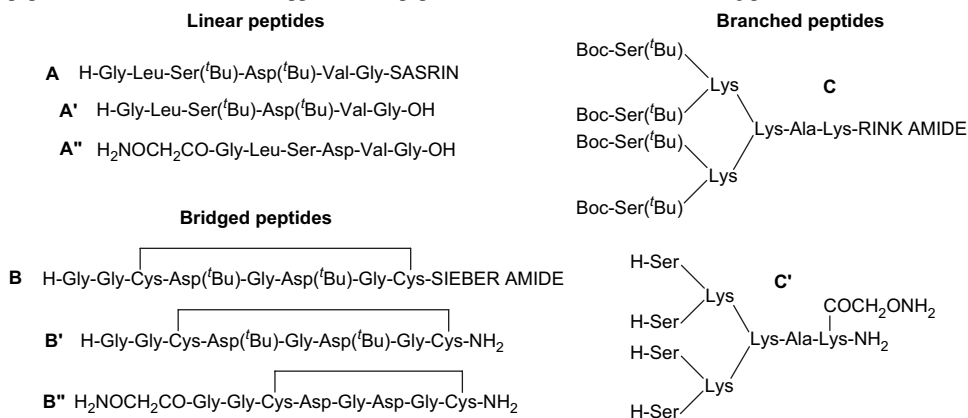
5% of TFA in acetonitrile, respectively. This result denotes a useful orthogonality between Eei and acid labile protecting groups such as Boc or <sup>t</sup>Bu. Moreover, the standard cleavage cocktail containing TFA/TIS/H<sub>2</sub>O ensured the complete deprotection of peptide, in contrast with cocktail containing

AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, which preserved the Eei and other acid labile protecting groups of the peptide.

### 2.3. Functionalization using active ester derivatives

We first studied the acylation of different peptides with these protected Aoa–OSu reagents. For this purpose, linear, bridged, and branched peptides were chosen as model peptides to incorporate aminoxy function either at the N-terminal end of peptides **A** and **B** or at the side chain of Lys residue of peptide **C** after removal of Alloc protecting group. All the peptides were synthesized manually on solid phase using the standard Fmoc/<sup>t</sup>Bu strategy. The peptide **B** was obtained after the formation of a disulfide bridge between two Cys(*S*-Trt) by an iodine-mediated oxidation.<sup>33</sup>

The coupling reactions of Aoa were performed at room temperature both in solid phase and in solution using 1 or 2 equiv of Aoa derivative and DIPEA (pH adjusted at 8) in

**Table 2.** Acylation of peptides **A**, **B**, and **C** on solid support and of peptides **A'**, **B'**, and **C'** in solution using protected Aoa–OSu **2** or **6**

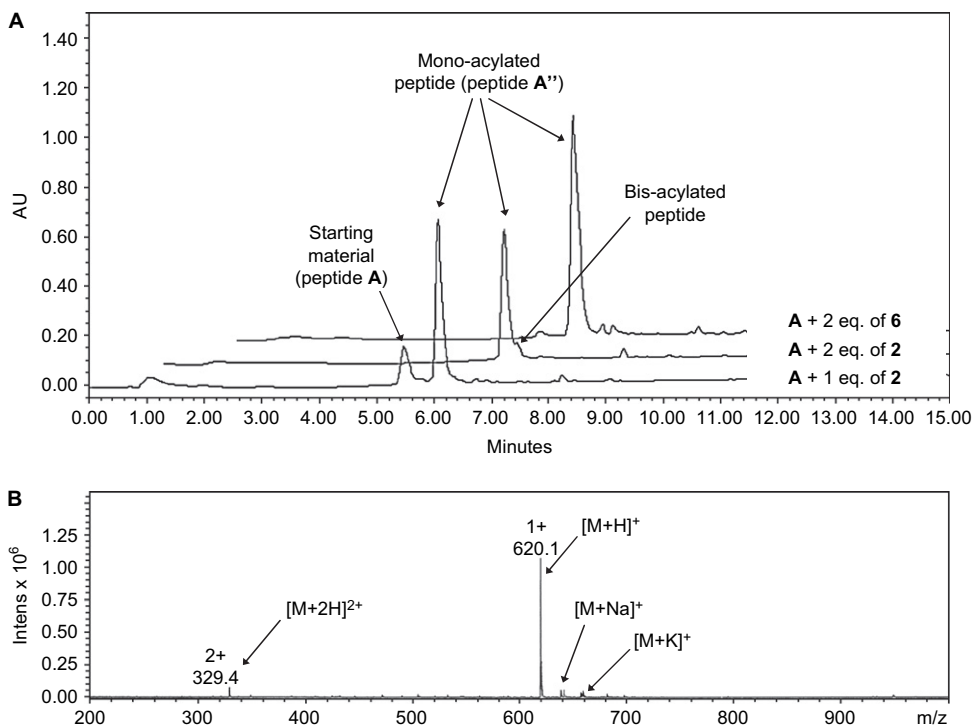
Peptide	Conditions <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> N-peptide		Mono-acylated peptide		Bis-acylated peptide	
		% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>
<b>A</b>	1 equiv of <b>2</b>	20	547.11 (547.27)	80	620.11 (620.29)	0	—
<b>A</b>	2 equiv of <b>2</b>	0	—	91	620.08	9	693.10 (693.31)
<b>A</b>	2 equiv of <b>6</b>	0	—	100	620.08	0	—
<b>B</b>	1 equiv of <b>2</b>	50	792.28 (792.30)	50	965.09 (965.35)	0	—
<b>B</b>	2 equiv of <b>2</b>	41	792.28	55	965.13	4	1138.22 (1138.44)
<b>B</b>	+2 equiv of <b>2</b>	0	—	88	965.03	12	1138.34
<b>B</b>	2 equiv of <b>6</b>	40	792.23	60	935.08 (935.34)	0	—
<b>B</b>	+2 equiv of <b>6</b>	0	—	100	934.91	0	—
<b>C</b>	1 equiv of <b>2</b>	d. <sup>d</sup>	949.11 (949.58)	d.	1022.08 (1022.59)	n.d.	1095.2 (1095.61)
<b>C</b>	2 equiv of <b>2</b>	d.	949.02	d.	1022.07	d.	1095.21
<b>C</b>	+2 equiv of <b>2</b>	n.d. <sup>d</sup>	—	d.	1022.17	d.	1095.31
<b>C</b>	2 equiv of <b>6</b>	d.	949.07	d.	1022.09	n.d.	—
<b>C</b>	+2 equiv of <b>6</b>	n.d.	—	d.	1022.14	n.d.	—
<b>A'</b>	1 equiv of <b>2</b>	30	547.06	70	620.12	0	—
<b>A'</b>	2 equiv of <b>2</b>	0	—	91	620.08	9	693.12
<b>A'</b>	2 equiv of <b>6</b>	0	—	100	620.12	0	—
<b>B'</b>	1 equiv of <b>2</b>	7	792.34	86	965.36	7	1138.78 (1138.44)
<b>B'</b>	2 equiv of <b>2</b>	0	792.28	80	965.89	20	1138.89
<b>B'</b>	2 equiv of <b>6</b>	0	—	100	934.75 (935.34)	0	—

<sup>a</sup> Reactions were performed in DMF in the presence of DIPEA (2 equiv, pH 8) for 45 min at room temperature.

<sup>b</sup> Percentage of each compound is determined by analytical RP-HPLC by the integration of each peak after cleavage (peptides **A**, **B**, and **C**) or by analyzing the reaction mixture (peptides **A'** and **B'**).

<sup>c</sup> Mass spectrometry analysis was performed by electrospray ionization method in positive mode (ESI-MS). The mass found is given for either protected (**B**) or fully deprotected peptides (**A** and **C**). Calculated mass is given in brackets.

<sup>d</sup> The high polarity of both mono- and bis-acylated peptide **C** prevents the identification of the corresponding peaks in our HPLC analysis conditions. Thus, no percentage can be calculated from HPLC profile and only a qualitative result obtained by MS analysis is given as detection (d.) or no detection (n.d.).



**Figure 3.** (A) Analytical RP-HPLC chromatogram ( $C_{18}$  column, linear gradient 5–60% B in 15 min, detection:  $\lambda=214$  nm) of crude peptide  $A''$  obtained after solid phase functionalization of peptide **A** with Boc–Aoa–OSu **2** or Eei–Aoa–OSu **6** followed by deprotection. (B) Mass spectrum (electrospray analysis, positive mode) of crude peptide  $A''$  obtained after solid phase functionalization of peptide **A** with Eei–Aoa–OSu **6** followed by deprotection.

DMF. The outcome of functionalization given in Table 2 was determined by analytical RP-HPLC by integrating the peaks corresponding to the mono- or bis-acylated peptide as well as by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) as illustrated in Figure 3.

On solid phase, we first observed that 1 equiv of Boc–Aoa–OSu **2** did not ensure a complete conversion since starting peptide **A**, **B**, or **C** was still observed after 45 min, therefore suggesting that an excess of reagent might be required. RP-HPLC chromatogram analysis of crude reaction mixtures (Fig. 3A) shows that 2 equiv of **2** was necessary to complete the reaction with peptide **A**, however, a significant quantity of overacylated compound (9%) was detected as previously reported.<sup>25,26</sup> Presumably due to the low accessibility of the amino anchoring site, one additional cycle was even necessary to get full reaction with peptides **B** and **C**, affording also the desired mono-acylated peptides  $B'$  and  $C'$  contaminated with an increased quantity of undesired bis-acylated side products. In contrast, the use of excess of imidate Eei–Aoa–OSu **6** (2 or 4 equiv) ensured the complete

conversion of peptides **A**, **B**, and **C** into the corresponding mono-acylated peptide. As expected, this new reagent allows the efficient preparation of pure aminoxy derivatives  $A'$ ,  $B'$ , and  $C'$  after deprotection since no trace of starting material and overacylated side product was detected by RP-HPLC and mass analysis (Fig. 3). The results obtained in solution with peptides  $A'$  and  $B'$  were very similar. As 2 equiv of Boc–Aoa–OSu **2** was necessary for the total conversion of starting material, 9% and 20% of the corresponding bis-acylated side products were obtained. On the other hand, the coupling reaction with Eei–Aoa–OSu **6** provided the desired aminoxy peptides  $A'$  and  $B'$  quantitatively.

#### 2.4. Functionalization using PyBOP coupling reagent

We further investigated the convenience of Eei protection for the functionalization of peptide with aminoxy moiety on solid phase using PyBOP coupling reagent. Eei–Aoa–OH **5** was introduced at the N-terminal end of peptide **A** and the outcome of N-overacylation was compared with the mono-protected Boc–Aoa–OH **1** (Table 3).

**Table 3.** Acylation of peptide **A** (H-Gly-Leu-Ser<sup>(t)Bu</sup>-Asp<sup>(t)Bu</sup>-Val-Gly-SASRIN) with protected-Aoa–OH and PyBOP

Conditions <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> N-peptide		Mono-acylated peptide		Bis-acylated peptide	
	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>	% <sup>b</sup>	MS found <sup>c</sup>
1 equiv of <b>1</b>	7	547.10 (547.27)	60	620.08 (620.29)	33	693.07 (693.31)
2 equiv of <b>1</b>	0	—	59	620.11	41	693.08
2 equiv of <b>5</b>	0	—	100	620.08	0	—

<sup>a</sup> Reactions were performed using 1 or 2 equiv of PyBOP in DMF in the presence of DIPEA (2 equiv, pH 8) for 45 min at room temperature.

<sup>b</sup> See Table 2.

<sup>c</sup> Mass spectrometry analysis was performed by ESI in positive mode. The mass found is given for fully deprotected peptide. Calculated mass is given in brackets.

We observed that 1 equiv of **2** led to a mixture of compounds corresponding to the starting material, the mono-, and bis-acylated peptides with 7%, 60%, and 33% ratio, whereas the use of 2 equiv of **2** dramatically increased the quantity of bis-acylated side product (41%). As expected, the efficiency of the Eei protection group was confirmed by the reaction with excess of Eei–Aoa–OH **5** and PyBOP since the aminoxy functionalized peptide **A'** was obtained cleanly. This interesting result suggests that the imidate **5** could be incorporated manually or automatically during the solid phase peptide elongation.

In summary, we have investigated the use of 1-ethoxyethylidene protected aminoxy acetic acid for the synthesis of aminoxy peptides suitable for oxime ligation. Two stable reagents prepared in one or two steps were incorporated into peptide sequence either using PyBOP coupling reagent or as *N*-hydroxysuccinimidyl ester (Eei–Aoa–OH **5** and Eei–Aoa–OSu **6**) and were easily deprotected under mild aqueous acidic conditions. In contrast with the corresponding Boc protected Aoa, the use of Eei derivatives prevents the formation of *N*-overacylated side product. Indeed, we have demonstrated that these new reagents ensure the efficient preparation of homogenous linear, bridged, or branched peptides bearing *N*-terminal or pendent oxyamine both in solution and on solid support. These results might find broad interests for bio-organic chemists who are interested in the synthesis of functional macromolecules by chemoselective methods. Particularly, this strategy is currently used in our laboratory for the preparation of multiepitopic anticancer vaccines<sup>29</sup> and molecular conjugate vectors.<sup>34</sup>

### 3. Experimental

#### 3.1. General

Protected amino acids, Sasrin, Sieber Amide, and Rink Amide MBHA resin were obtained from Advanced Chem-Tech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Brettonneux, France), and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP was purchased from France Biochem and other reagents were obtained from either Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France). RP-HPLC was performed on Waters equipment equipped with a 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. The purity of peptide derivatives were analyzed on an analytical column (Macherey–Nagel Nucleosil 120 Å 3 µm C<sub>18</sub> particles, 30×4.6 mm, flow rate of 1.3 mL min<sup>-1</sup> for 15 min gradient, Nucleosil 100 Å 5 µm C<sub>18</sub> particles, 250×4.6 mm, flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> for 30 min gradient) using linear gradient and the following solvent system: solvent A, water containing 0.09% TFA; solvent B, acetonitrile containing 0.09% TFA and 9.91% H<sub>2</sub>O. UV absorbance was monitored at 214 and 250 nm simultaneously. Semi-preparative column (Delta-Pak™ 100 Å 15 µm C<sub>18</sub> particles, 200×2.5 mm) was used to purify crude peptides (when necessary) by using an identical solvent system at a flow rate of 22 mL min<sup>-1</sup>. The direct chemical ionization (DCI) mass spectra were obtained on a Thermo Filligan PolarisQ with NH<sub>3</sub>/isobutane as the reagent gas. The electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was recorded on a VG Platform II (Micromass).

The analysis was performed in the positive mode for peptide derivatives using 50% aqueous acetonitrile as an eluent.

#### 3.2. Synthesis of Aoa derivatives

**3.2.1. *N'*-Boc-aminoxyacetyl *N*-hydroxysuccinimide ester (**2**).** To a stirred solution of *N*-Boc 2-aminoxyacetic acid **1** (0.500 g, 2.6 mmol) in EtOAc/dioxane (1:1, 10 mL) at 0 °C were added *N*-hydroxysuccinimide (0.310 g, 2.7 mmol) and DCC (0.563 g, 2.7 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5 h and then filtered through a pad of Celite. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in EtOAc and washed with aqueous NaHCO<sub>3</sub>, water, and brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The crude solid was recrystallized from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ether/pentane thereby providing pure and white solid (0.618 g, 2.14 mmol, 83%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.66 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 2.87 (s, 4H), 1.49 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.8, 171.1, 168.7, 165.1, 70.9, 28.1, 25.6, 25.4; DCI-MS calcd for C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: 306.1; found: *m/z* 305.8 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

**3.2.2. *N*-(1-Ethoxyethylidene)2-aminoxyacetic acid (**5**).** To a stirred solution of iodoacetic acid **4** (5.00 g, 26.9 mmol) in water (10 mL) was added an aqueous solution of NaOH (1.6 mL, 40%) at 0 °C. After reaching room temperature, ethyl *N*-hydroxyacetimidate **3** (4.16 g, 40.3 mmol) was added followed by an aqueous solution of NaOH (2.5 mL, 40%) and water (10 mL) to get a basic pH (>12). The mixture was stirred for 5 h at 80 °C and cooled at room temperature. Water was then added (50 mL) and the aqueous solution was extracted successively with Et<sub>2</sub>O and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The aqueous phase was brought to pH 2–3 with concentrated hydrochloric acid. The acidified aqueous phase was then extracted with AcOEt and these combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuum. The compound **5** was obtained as a colorless oil (2.99 g, 18.6 mmol, 69%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.48 (s, 2H), 4.00 (q, 2H, *J*=7.2 Hz), 2.01 (s, 3H), 1.27 (t, 3H, *J*=7.2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 174.5, 70.2, 62.8, 14.2, 14.0; ESI-MS calcd for C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>: 162.2; found: *m/z* 162.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**3.2.3. *N'*-(1-Ethoxyethylidene)2-aminoxyacetyl *N*-hydroxysuccinimide ester (**6**).** The activated ester **6** was obtained following the procedure described for **2**. After filtration of DCU and evaporation, the residue was purified by a flash chromatography on silica gel with AcOEt/hexane (1:1) and recrystallized in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/pentane to get **6** as single crystals (3.3 g, 12.7 mmol, 68%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.78 (s, 2H), 4.01 (q, 2H, *J*=7.2 Hz), 2.84 (s, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.28 (t, 3H, *J*=7.2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.8, 165.7, 164.8, 68.5, 62.8, 25.6, 14.2, 13.9; DCI-MS (positive mode) calcd for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 259.1; found: *m/z* 259.2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3.3. Peptides synthesis

**3.3.1. Standard procedures for solid phase synthesis of peptides.** The synthesis of all protected peptides was carried out manually using Fmoc/<sup>t</sup>Bu strategy in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The coupling reactions were performed using, relative to the resin loading,

2 equiv of *N*- $\alpha$ -Fmoc protecting amino acids activated in situ with 2 equiv of PyBOP and 4 equiv of DIPEA in DMF (10 mL/g of resin) for 30 min. After washing with DMF (4 $\times$ 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 $\times$ 1 min), the completeness of the coupling reactions was controlled by TNBS test. *N*- $\alpha$ -Fmoc protection was removed by treatment with a piperidine/DMF solution (1:4, 10 mL/g of resin) for 10 min. The process was repeated two times. After washing the resin with DMF (6 $\times$ 1 min), the loading of the resin was quantified by measuring the absorption of washing solutions at 299 nm.

### 3.3.2. H-Gly-Leu-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Asp(<sup>t</sup>Bu)-Val-Gly-OH (A').

The linear protected peptide **A** was synthesized using the Sasrin resin (450 mg, loading: 0.68 mmol/g) following the standard procedure. One part of the resin was used for the solid phase functionalization with Aoa derivatives (peptide **A**). With the second part of the resin, the peptide was cleaved by successive treatments with a solution of 1% TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> until the resin became dark purple. The combined washings were concentrated under reduced pressure and white solid peptides were obtained by precipitation from ether (135 mg, 0.2 mmol, 68%). The protected linear peptide **A'** was used for functionalization with Aoa derivatives without further purification. Analytical RP-HPLC:  $t_R$ =6.1 min (5–60% B in 15 min); ESI-MS (positive mode) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> 659.39; found:  $m/z$  659.11 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.3.3. H-Gly-Gly-c[Cys-Asp(<sup>t</sup>Bu)-Gly-Asp(<sup>t</sup>Bu)-Cys]-NH<sub>2</sub> (B').

The protected cyclic peptide **B** was synthesized on Sieber Amide resin (1 g, loading: 0.72 mmol/g) following the standard procedure. A solution of iodine (1.97 mg, 7.7 mmol) in DMF (10 mL) was added to the resin and stirred for 4 h. The solution was filtered and the resin was washed with DMF (10 $\times$ 1 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 $\times$ 1 min), and DMF until washing solution became colorless. One part of the resin was used for the solid phase functionalization with Aoa derivatives (peptide **B**). With the second part of the resin, the peptide was cleaved by successive treatments with a solution of 1% TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> until the resin became dark purple. The combined washings were concentrated under reduced pressure and white solid peptides were obtained by precipitation from ether (402 mg, 0.52 mmol, 71%). This protected cyclic peptide **B'** was used for functionalization with Aoa derivatives after semi-preparative RP-HPLC purification (5–100% B in 30 min). Analytical RP-HPLC:  $t_R$ =6.3 min (5–100% B in 15 min); ESI-MS (positive mode) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>: 792.28; found:  $m/z$  792.30 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.3.4. BocSer(<sup>t</sup>Bu)-Lys[BocSer(<sup>t</sup>Bu)]-Lys{BocSer(<sup>t</sup>Bu)-Lys[BocSer(<sup>t</sup>Bu)]}-Ala-Lys-Rink amide (C).

Peptide **C** protected with an Alloc on the C-terminal lysine side chain was synthesized on Rink Amide MBHA resin (450 mg, loading: 0.69 mmol/g). The Alloc protecting group was removed by adding a solution of phenylsilane (3.9 mL, 31.5 mmol) and tetrakis(triphenyl)palladium (91 mg, 0.08 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) to the resin, and the solution was mixed under argon for 20 min. The resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 $\times$ 1 min), dioxane/water (9:1, 2 $\times$ 1 min), DMF (2 $\times$ 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 $\times$ 1 min). For analysis an aliquot of the resin was cleaved with a solution of TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) for 2 h. ESI-MS (positive

mode) of fully deprotected peptide calcd for C<sub>39</sub>H<sub>77</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub>: 949.57; found:  $m/z$  949.23 [M+H]<sup>+</sup>.

## 3.4. Standard procedure for functionalization of peptides with Aoa derivatives

### 3.4.1. Solid phase functionalization with Boc-Aoa-OH 1 and Eei-Aoa-OSu 5 with PyBOP.

A solution of 1 equiv of Boc-Aoa-OH **1** or 2 equiv of Eei-Aoa-OH **5** (relative to the resin loading of peptide **A**), 1 equiv of PyBOP (or 2 equiv for **5**) and 2 equiv of DIPEA (or 2 equiv for **5**, pH 8) in dry DMF was added to the resin. After shaking for 45 min at room temperature, the solution was filtered and the resin was washed with DMF (5 $\times$ 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 $\times$ 1 min). The completeness of the coupling reaction was controlled by TNBS test. Each peptide was finally obtained upon acidic cleavage and deprotection by treatment of the resin with a mixture of TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) for 2 h. After evaporation of the cleavage solution, the peptides were precipitated with diethyl ether and analyzed by RP-HPLC and ES-MS. Deprotected aminoxy peptide **A'**: analytical RP-HPLC:  $t_R$ =5.9 min (5–60% B in 15 min); ESI-MS (positive mode) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>: 620.29; found:  $m/z$  620.11 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.4.2. Solid phase functionalization with Boc-Aoa-OSu 2 and Eei-Aoa-OSu 6.

A solution of 1 equiv of Boc-Aoa-OSu **2** or 2 equiv of Eei-Aoa-OSu **6** (relative to the resin loading of peptide **A**, **B**, or **C**) and 1 equiv of DIPEA (pH 8) in dry DMF was added to the resin. After shaking for 45 min at room temperature, the solution was filtered and the resin was washed with DMF (5 $\times$ 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 $\times$ 1 min). The completeness of the coupling reaction was controlled by TNBS test. If necessary, this process is repeated once. Each peptide was finally obtained upon acidic cleavage and deprotection by treatment of the resin with a mixture of TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) for 2 h. After evaporation of the cleavage solution, the peptides were precipitated with diethyl ether and analyzed by ES-MS. Deprotected aminoxy peptide **A'**: see Section 3.4.1; deprotected aminoxy peptide **B'**: analytical RP-HPLC:  $t_R$ =12.6 min (0–30% B in 30 min); ES-MS (positive mode) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>: 753.19; found:  $m/z$  753.01 [M+H]<sup>+</sup>. Deprotected aminoxy peptide **C'**: analytical RP-HPLC:  $t_R$ =7.5 min (5–40% B in 30 min); ESI-MS (positive mode) calcd for C<sub>41</sub>H<sub>80</sub>N<sub>15</sub>O<sub>15</sub>: 1022.59; found:  $m/z$  1022.07 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.4.3. Functionalization with Boc-Aoa-OSu 2 and Eei-Aoa-OSu 6 in solution.

The functionalization reaction was realized using 1 equiv of Boc-Aoa-OSu **2** (relative to quantity of peptide **A'** or **B'**), 1 equiv of DIPEA (pH 8) in dry DMF. The reaction was monitored by RP-HPLC. After 45 min, the solution was evaporated and the peptide precipitated in diethyl ether. The peptides were finally deprotected by treatment with a solution of TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) for 2 h. After evaporation of the cleavage solution, the peptides were precipitated with diethyl ether and analyzed by RP-HPLC and ESI-MS (see Section 3.4.2).

## Acknowledgements

This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Joseph Fourier

(UJF), and COST D-34. We also acknowledge the Ministère de la Recherche for ACI-2003 'Molécules et Cibles Thérapeutiques' and for Grant No. 15432-2004 to V.D.

### References and notes

1. Kimmerlin, T.; Seebach, D. *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229.
2. Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506.
3. Langenhan, J. M.; Thorson, J. S. *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 59.
4. Koehn, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *4*, 3106.
5. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128.
6. Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30.
7. Canne, L. E.; Ferre-D'Amare, A. R.; Adrian, R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1998.
8. Shao, J.; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998.
9. Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 537.
10. Rodriguez, E. C.; Winans, K. A.; King, D. S.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905.
11. Cervigni, S. E.; Dumy, P.; Mutter, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 1230.
12. Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243.
13. Forget, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7829.
14. Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. *Chem.—Eur. J.* **2001**, *7*, 3976.
15. Renaudet, O.; Reymond, J.-L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4693.
16. Zhou, X.; Zhou, J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1451.
17. Falsey, J. R.; Renil, R.; Park, S.; Li, S.; Lam, K. S. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 346.
18. Liu, Y.; Chai, W.; Childs, R. A.; Feizi, T. *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 326.
19. Defrancq, E.; Hoang, A.; Vinet, F.; Dumy, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2683.
20. Chen, X.; Lee, G. S.; Zettl, A.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6112.
21. Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Cell* **2006**, *126*, 851.
22. Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475.
23. Melnyk, O.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Gras-Masse, H. *Biopolymers* **2000**, *55*, 165.
24. Brask, J.; Jensen, K. J. *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 290.
25. Decostaire, I. P.; Lelièvre, D.; Zhang, H.; Delmas, A. F. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7057.
26. Jiménez-Castells, C.; de la Torre, B. G.; Gutiérrez Gallego, R.; Andreu, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5155.
27. Lee, M.-R.; Lee, J.; Baek, B.-H.; Shin, I. *Synlett* **2003**, 325.
28. Unpublished result.
29. Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *5*, 1149.
30. Ide, H.; Akamatsu, K.; Kimura, Y.; Michiue, K.; Makino, K.; Asaeda, A.; Takamori, Y.; Kubo, K. *Biochemistry* **1993**, *32*, 8276.
31. Stanek, J.; Frei, J.; Mett, H.; Schneider, P.; Regenass, U. *J. Med. Chem.* **1992**, *30*, 1339.
32. Crystallographic data (excluding structure factors) of Eei-Aoa-OSu **6** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary publication number CCDC-644968. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK. [Fax: +44 1223 336 033 or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).]
33. Han, Y.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3841.
34. Garanger, E.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402.





## Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction

Béatrice LAUDET\*†‡, Caroline BARETTE§, Vincent DULERY‡||, Olivier RENAUDET‡||, Pascal DUMY‡||, Alexandra METZ\*†‡, Renaud PRUDENT\*†‡, Alexandre DESHIÈRE\*†‡, Otto DIDEBERG¶, Odile FILHOL\*†‡ and Claude COCHET\*†‡<sup>1</sup>

\*Inserm, U873, Grenoble, F-38054, France, †CEA, IRTSV/LTS, Grenoble, F-38054, France, ‡Université Joseph Fourier, Grenoble, France, §CEA, IRTSV/CMBA, Grenoble, F-38054, France, ||CNRS, UMR-5250, ICMG FR-2607, Grenoble, France, and ¶CNRS, CEA, IBS/LCM, Grenoble, France

X-ray crystallography studies, as well as live-cell fluorescent imaging, have recently challenged the traditional view of protein kinase CK2. Unbalanced expression of catalytic and regulatory CK2 subunits has been observed in a variety of tissues and tumours. Thus the potential intersubunit flexibility suggested by these studies raises the likely prospect that the CK2 holoenzyme complex is subject to disassembly and reassembly. In the present paper, we show evidence for the reversible multimeric organization of the CK2 holoenzyme complex *in vitro*. We used a combination of site-directed mutagenesis, binding experiments and functional assays to show that, both *in vitro* and *in vivo*, only a small set of primary hydrophobic residues of CK2 $\beta$  which contacts at the centre of the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interface dominates affinity. The results indicate that a double mutation in CK2 $\beta$  of

amino acids Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup>, which are complementary and fill up a hydrophobic pocket of CK2 $\alpha$ , is the most disruptive to CK2 $\alpha$  binding both *in vitro* and in living cells. Further characterization of hotspots in a cluster of hydrophobic amino acids centred around Tyr<sup>188</sup>–Phe<sup>190</sup> led us to the structure-based design of small-peptide inhibitors. One conformationally constrained 11-mer peptide (Pc) represents a unique CK2 $\beta$ -based small molecule that was particularly efficient (i) to antagonize the interaction between the CK2 subunits, (ii) to inhibit the assembly of the CK2 holoenzyme complex, and (iii) to strongly affect its substrate preference.

**Key words:** CK2 protein kinase, cyclic peptide, hotspot, peptide disruptor, protein–protein interaction, substrate specificity.

### INTRODUCTION

All but a handful of the protein kinase family members are monomeric enzymes which are often regulated by reversible phosphorylation. In contrast, the regulation and the molecular architecture of multisubunit serine/threonine protein kinases such as phosphorylase kinase [1], cAMP-dependent protein kinase [2], cyclin-dependent protein kinases [3], DNA-dependent protein kinase [4], 5'-AMP-activated protein kinase [5] and I $\kappa$ B (inhibitory  $\kappa$ B) kinase [6] rely on the reversible binding of regulatory subunits to the catalytic subunits of these enzymes. The presence of the regulatory subunit either can play a negative role on the catalytic subunit (e.g. cAMP-dependent protein kinase [7]) or is a prerequisite for activation (e.g. cyclin-dependent protein kinases [3]).

Protein kinase CK2 shares with few other protein kinases a quaternary structure consisting of two catalytic subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$ ) and two regulatory subunits (CK2 $\beta$ ) [8]. However, as compared with other multisubunit protein kinases, CK2 exhibits notable distinguishing structural and functional features [9,10]. CK2 catalytic subunits possess constitutive activity [11,12], but CK2 $\beta$  is a central component of the tetrameric CK2 complex [13], controlling CK2 substrate specificity, cellular localization and enzymatic activity. In this respect, CK2 $\beta$  operates as a targeting subunit and/or a docking platform affecting the accessibility to the catalytic site of binding substrates whose phosphorylation is either stimulated or prevented by the CK2 $\beta$  subunit [14,15]. In this context, the spontaneous high-affinity association of recombinant

CK2 subunits in a stable heterotetrameric complex (dissociation constant,  $K_d$ , of 5.4 nM), as well as numerous complementary biochemical observations led to the long-held tenet that CK2 is a strong obligate complex. However, this traditional view was challenged when X-ray crystallography studies revealed that the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interface is smaller than the surface contacts that are usually observed in stable protein complexes [13]. The possible intersubunit flexibility suggested by these studies was reinforced further by the observation of independent movement of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  in living cells [16]. In addition, the presence in mouse brain and testes of a CK2 $\beta$  fraction devoid of CK2 $\alpha$  [17] and a pool of free CK2 $\alpha'$  in prostate tumour cells [18] have been reported. Collectively, these observations raise the likely prospect that the CK2 holoenzyme complex is subject to disassembly and reassembly [19]. As CK2 substrates localize to many different subcellular compartments, a dynamic interaction of CK2 subunits should increase the kinase specificity, and the assembly of the complex is a likely point of regulation [20]. The ability to interfere with specific protein–protein interactions has already provided powerful means of influencing the functions of selected proteins within the cell [21,22]. Thus the potential intersubunit flexibility of the CK2 holoenzyme complex makes it amenable to drug-discovery efforts aimed at inhibiting this protein–protein interaction.

In the present paper, we show evidence for the reversible multimeric organization of the CK2 holoenzyme complex *in vitro*. Site-directed mutagenesis, binding experiments and functional assays provided further insights into the molecular interaction

Abbreviations used: BiFC, bimolecular fluorescence complementation; CK2 $\beta$ -F, F190A single mutant of CK2 $\beta$ ; CK2 $\beta$ -M, M166A single mutant of CK2 $\beta$ ; CK2 $\beta$ -Y, Y188A single mutant of CK2 $\beta$ ; CK2 $\beta$ -YF, Y188A/F190A double mutant of CK2 $\beta$ ; CK2 $\beta$ -MYF, M166A/Y188A/F190A triple mutant of CK2 $\beta$ ; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione transferase; GST- $\beta$  C-ter, GST–CK2 $\beta$ -(182–215); HBS, HEPES-buffered saline; MBP, maltose-binding protein; RP, reverse phase; TFA, trifluoroacetic acid; YC-CK2, CK2 with C-terminal EGYP tag; YN-CK2, CK2 with N-terminal EGYP tag.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email [claudio.cochet@cea.fr](mailto:claudio.cochet@cea.fr)).



between the CK2 subunits, demonstrating that, both *in vitro* and *in vivo*, only a small set of primary hydrophobic residues of CK2 $\beta$  which make contacts at the centre of the interface dominate affinity. Characterization of hotspots led us to a structure-based design of small peptide inhibitors derived from the CK2 $\beta$  C-terminal domain. One conformationally constrained 11-mer peptide can efficiently antagonize the interaction between the CK2 subunits, representing the first small molecule that binds to this hydrophobic interface. The present study represents the first step of a systematic approach to set the framework for the discovery and development of chemical inhibitors of this interaction.

## EXPERIMENTAL

### Materials

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) was purchased from MP Biosciences. The peptide substrate (RRREDEESDDEE) for CK2 kinase assay was obtained from NeoMPS. The purity of this peptide (89%) was determined by HPLC on a Nucleosil C<sub>18</sub> column using a linear triethanolamine phosphate/acetonitrile gradient. Solvents were of analytical grade. Cyclic peptides, biotinylated cyclic peptides and alanine-mutated cyclic peptides were synthesized by Eurogentec. The pEYFPc1 vector was purchased from Clontech Laboratories. EcoRI and BamHI restriction enzymes were from Invitrogen, and SacI and AgeI were from New England Biolabs.

### Chemicals, peptide synthesis and purification

All chemical reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich, Acros or Carlo-Erba and were used without further purification. All protected amino acids were obtained from Advanced ChemTech Europe, Bachem Biochimie SARL and France Biochem S.A. RP (reverse-phase)-HPLC analyses were performed using Waters equipment. The analytical [Nucleosil 120 Å (1 Å = 0.1 nm) pore size, 3  $\mu$ m diameter C<sub>18</sub> particles, 30 mm long  $\times$  4.6 mm<sup>2</sup> cross-sectional area] column was operated at 1.3 ml/min, and the preparative (Delta-Pak 300 Å pore size, 15  $\mu$ m diameter C<sub>18</sub> particles, 200 mm long  $\times$  25 mm<sup>2</sup> cross-sectional area) column at 22 ml/min with UV monitoring at 214 and 250 nm using a linear buffer A–B gradient [buffer A: 0.09% TFA (trifluoroacetic acid) in water; buffer B: 0.09% TFA in 90% acetonitrile]. Mass spectra were obtained by ESI (electrospray ionization) MS on a VG Platform II in the positive mode.

The protected linear peptides were assembled manually on solid-phase using the standard Fmoc (fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)/tBu (t-butyl) strategy with PyBOP<sup>®</sup> (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) as a coupling reagent on the acid-labile SASRIN<sup>®</sup> resin. They were cyclized directly without further purification, as reported previously [23]. For all peptides, glycine was chosen as the C-terminal end to secure the subsequent cyclization step from epimerization. The protected cyclic peptides were finally treated with a solution of TFA/TIS (tri-isopropylsilane)/water (95:2.5:2.5, by vol.) for 2 h. After evaporation, the cyclic peptides were purified by RP-HPLC. The purified cyclic peptides were homogeneous and showed expected primary ion molecular masses by MS.

### Proteins

Human recombinant His<sub>6</sub>-tagged CK2 $\alpha$ , GST (glutathione transferase)-CK2 $\alpha$  and GFP (green fluorescent protein)-CK2 $\alpha$  were obtained as described previously [16,24]. Expression

and purification of chicken recombinant MBP (maltose-binding protein)-CK2 $\beta$  were performed as described previously [25]. GST-CK2 $\beta$ -(182–215), referred to as GST- $\beta$  C-ter, was obtained by cloning by PCR the 33 C-terminal amino acids of CK2 $\beta$  in pGEX4T1. Two recombinant proteins, MBP-CDC25B (kindly provided by Bernard Ducommun, Université Paul Sabatier, Toulouse, France) and GST-Olig2-(1–177) (kindly provided by Thierry Buchou, iRTSV/LTS), were used as CK2 $\beta$ -dependent CK2 substrates.

### *In vitro* kinase assay

CK2 kinase assays were performed in a final assay volume of 18  $\mu$ l containing 3  $\mu$ l of CK2 $\alpha$  (36 ng) and a mixture containing 1 mM peptide substrate, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 1  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The final concentration of ATP was 100  $\mu$ M. Assays were performed under linear kinetic conditions for 5 min at room temperature (22 °C) before termination by the addition of 60  $\mu$ l of 4% trichloroacetic acid [26].

### *In vitro* CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$ interaction assay

The CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  interaction assay involved competition between plate-bound MBP-CK2 $\beta$  and various soluble peptides for binding to soluble [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$ . The assay was performed in Reacti-Bind streptavidin-coated high-binding-capacity 96-well plates (Pierce) in which each well was coated with 250 ng of biotinylated MBP-CK2 $\beta$  {using sulfo-NHS-LC-LC-biotin [sulfo-succinimidyl-6'-(biotinamido)-6-hexanamide hexanoate] with a spacer arm of 30.5 Å length (Pierce)} in 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, and 0.4 M NaCl buffer for 1 h at room temperature. After three washes with 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl and 0.05% Tween 20, the wells were blocked with 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl and 3% BSA for 1 h at room temperature. After three washes, competing peptides were added to each well in 50 mM Tris/HCl, pH 7.2, and 0.4 M NaCl, along with [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  (10<sup>5</sup> c.p.m.) synthesized *in vitro* by using the TNT<sup>®</sup> Quick coupled transcription/translation system (Promega). The plates were incubated for 1 h at room temperature, and, after three washes, the radioactivity or the fluorescence of each well in the plate was determined using a scintillation counter. Positive control (100% competition) was determined with a 10-fold molar excess of untagged CK2 $\alpha$ , and negative control (0% competition) was performed in the absence of competitor. The IC<sub>50</sub> is defined as the concentration of peptide necessary to inhibit 50% of the CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  complex formation.

### Pull-down assays

GST-tagged proteins were immobilized on glutathione-Sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham Biosciences), for 1 h at 4 °C, in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5. Beads were then incubated with CK2 $\alpha$  for 1 h at 4 °C. After four washes, CK2 $\alpha$  activity was measured as described above.

MBP-CK2 $\beta$  (5  $\mu$ g) was immobilized on amylose beads (New England Biolabs) for 1 h at 4 °C in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.5 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EGTA and 0.05% Tween 20. Buffer was replaced by 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl and 0.05% Tween 20. Then, increasing amounts of GST- $\beta$  C-ter were added along with 5  $\mu$ g of GST-CK2 $\alpha$  for 20 min at 4 °C. After four washes, one-tenth of the beads was used for CK2 activity assay, and the remaining beads were used for CK2 $\alpha$  detection by Western blotting.

### Size-exclusion chromatography

An Ultrogel ACA34 gel-filtration column (0.5 cm × 30 cm) was equilibrated in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, and 0.4 M NaCl and was calibrated using aldolase (molecular mass of 158 kDa), BSA (molecular mass of 68 kDa) and carbonic anhydrase (molecular mass of 29 kDa) as standards. CK2 $\alpha$  (50  $\mu$ g) alone or CK2 $\alpha$  (50  $\mu$ g) incubated with GST- $\beta$  C-ter (30  $\mu$ g) for 30 min at 4 °C was loaded on to the column. Eluted fractions (0.25 ml) were collected and assayed for the presence of CK2 $\alpha$  and GST- $\beta$  C-ter by Western blotting.

### Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis of CK2 $\beta$  was performed with the pMALc2-CK2 $\beta$  vector using the QuikChange<sup>®</sup> site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and specific primers from Eurogentec to generate different mutant MBP-CK2 $\beta$  proteins. Primers were M166A sense, 5'-GTTCCCCCATGCGCTCTCATGGTG-3', Y188A sense, 5'-GTGCCAGGCTGGCTGGTTC AAGATCCACCCTATGG-3', and F190A sense, 5'-GTGCCAGGCTGTATGGGGCCAAGATCCACCCTATGG-3'. MBP-CK2 $\beta$  mutant proteins were expressed in BL21 *Escherichia coli* cells and were purified as described previously [25] and stored at -80 °C in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 0.5 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EGTA, and protease inhibitors (Sigma).

### Surface plasmon resonance spectroscopy

Surface plasmon resonance measurements were performed using a BIAcore 3000 instrument. The running buffer was HBS (Hepes-buffered saline: 10 mM Hepes, pH 7.3, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA and 0.005 % polysorbate 20). The carboxymethylated dextran surface of a CM5 sensor chip (BIAcore AB) was activated by injecting a coupling solution of *N*-hydroxysuccinimide and *N*-ethyl-*N*-(dimethylaminopropyl)carbodi-imide hydrochloride (BIAcore AB). Anti-GST antibody was diluted to 30  $\mu$ g/ml in 10 mM acetate buffer, pH 5.0, and injected over the surface of the sensor chip for 7 min at a flow rate of 5  $\mu$ l/min. The unreacted sites of the sensor chip surface were then quenched by injection of 1 M ethanolamine, pH 8.5. GST-CK2 $\alpha$  (50  $\mu$ g/ml) was immobilized on the surface at a flow rate of 5  $\mu$ l/min in HBS. Different MBP-CK2 $\beta$  mutants were diluted to 50  $\mu$ g/ml in HBS and injected over the surface at a flow rate of 5  $\mu$ l/min. Regeneration of the surfaces was achieved by injection of 10 mM glycine/HCl, pH 2.2.

### Plasmid constructs, cell transfections and BiFC (bimolecular fluorescence complementation) analysis

Full-length chicken CK2 $\alpha$  sequence was cloned into the pEYFPc1 vector using EcoRI restriction sites, then oriented with BamHI digestion to generate the pEYFPc1-CK2 $\alpha$  construct. Full-length mouse CK2 $\beta$  sequence was cloned into the same pEYFPc1 vector using BamHI restriction sites, then oriented with EcoRI digestion to generate the pEYFPc1-CK2 $\beta$  construct. Subsequently, the EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) sequence was replaced with the 1–154 or the 155–238 fragment of EYFP. These fragments were PCR-amplified and inserted using SacI/AgeI to generate BiFC plasmid constructs. The resulting N- and C-terminal EYFP-CK2 fusions are referred to as YN-CK2 $\alpha$ , YN-CK2 $\beta$ , YC-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  respectively. Primers (Eurogentec) for YN-CK2 $\alpha$  and YN-CK2 $\beta$  were 5'-GCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAG-3' and 5'-CAACAGTCTATATCATGCGAGCTCAGGCTTCGAATTCTGC-3' respectively. Primers for YC-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  were 5'-CCGTCAGATCCGCTCGCGCTACCGGTCATGGCCGAC-

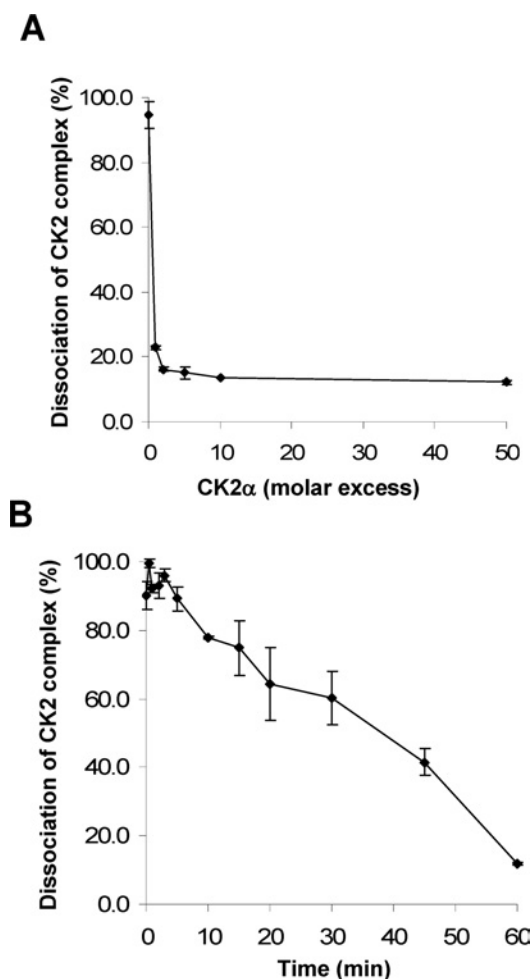
AAGCAGAAGAACGGC-3' and 5'-CGAAGCTTGAGCTCG-AGATCTGAGTCCGG-3' respectively. All of the constructs were verified by sequencing.

HeLa cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10 % fetal calf serum. At 1 day before transfection, cells were seeded in Lab-Tek<sup>®</sup> chambers (Nunc) and transfected with the different BiFC plasmid constructs using Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. At 4 h after transfection, cells were washed with PBS and incubated with fresh medium for 24 h at 37 °C and then switched to 30 °C for 2 h to promote fluorophore maturation [27]. Preliminary experiments have shown that a fraction of YN-CK2 $\alpha$  or YC-CK2 $\alpha$  and YN-CK2 $\beta$  or YC-CK2 $\beta$  could interact with endogenous CK2 $\beta$  and CK2 $\alpha$ , trapping a part of EYFP devoted to fluorescence complementation [28]. Therefore, to enhance the signal, immunostaining of EYFP was performed by indirect immunofluorescence using the mouse anti-GFP antibody (Abcam) which recognizes only full-length EYFP, but neither N-terminal (1–154) nor C-terminal (155–238) EYFP (see Supplementary Figure 1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/408/bj4080363add.htm>). Under similar transfection conditions, polyclonal anti-GFP antibody (Abcam) did not discriminate between full-length and EYFP half-molecules (results not shown). Thus cells were fixed with 4 % (w/v) paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.5 % Triton X-100 for 10 min, pre-incubated with 5 % goat serum for 30 min at room temperature, and incubated with the mouse anti-GFP as primary antibody for 1 h at room temperature, washed with PBS and incubated with goat anti-mouse IgG-conjugated Cy3 (indocarbocyanine) (Molecular Probes) for 45 min at room temperature in the dark. Nuclei were stained with 2  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma) and coverslips were mounted with Dako (Dakocytomation), and examined using a Zeiss Axiovert 200 microscope and a 40 × 1.3 Plan-Neofluar<sup>®</sup> objective. The results were expressed as the percentage of cells that were above the fluorescence threshold observed in cells expressing only YN-CK2 $\alpha$  or YN-CK2 $\beta$ . Because the amount of expressed proteins is critical to the interpretation of results, the expression levels of the different chimaeras were also analysed in transfected cells by Western blotting using anti-CK2 $\alpha$  or -CK2 $\beta$  antibodies as described previously [16,29].

## RESULTS

### Reversibility of the CK2 subunit multimeric organization *in vitro*

Surface plasmon resonance measurements with purified recombinant CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits showed that they assemble rapidly ( $t_{1/2}$  = 60 s) into a stable heterotetrameric complex with nanomolar affinity ( $K_d$  = 5.4 nM) with a  $k_a$  (association rate constant) and  $k_d$  (dissociation rate constant) of  $6.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  and  $3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  respectively [30]. However, X-ray crystallography has revealed that the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  interface was relatively small (832 Å<sup>2</sup>) and flexible, raising the possibility that CK2 tetramers may be subjected to disassembly and reassembly [13]. To test this hypothesis, we performed a competition binding assay in which complexes between MBP-CK2 $\beta$  and [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  were incubated with an increasing molar excess of CK2 $\alpha$ . As shown in Figure 1(A), [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  was efficiently displaced from the pre-formed complex by the CK2 $\alpha$  subunit. The residual radioactivity (15 %) may represent [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  present in misfolded CK2 complexes that are resistant to dissociation. In the presence of a 10-fold molar excess of



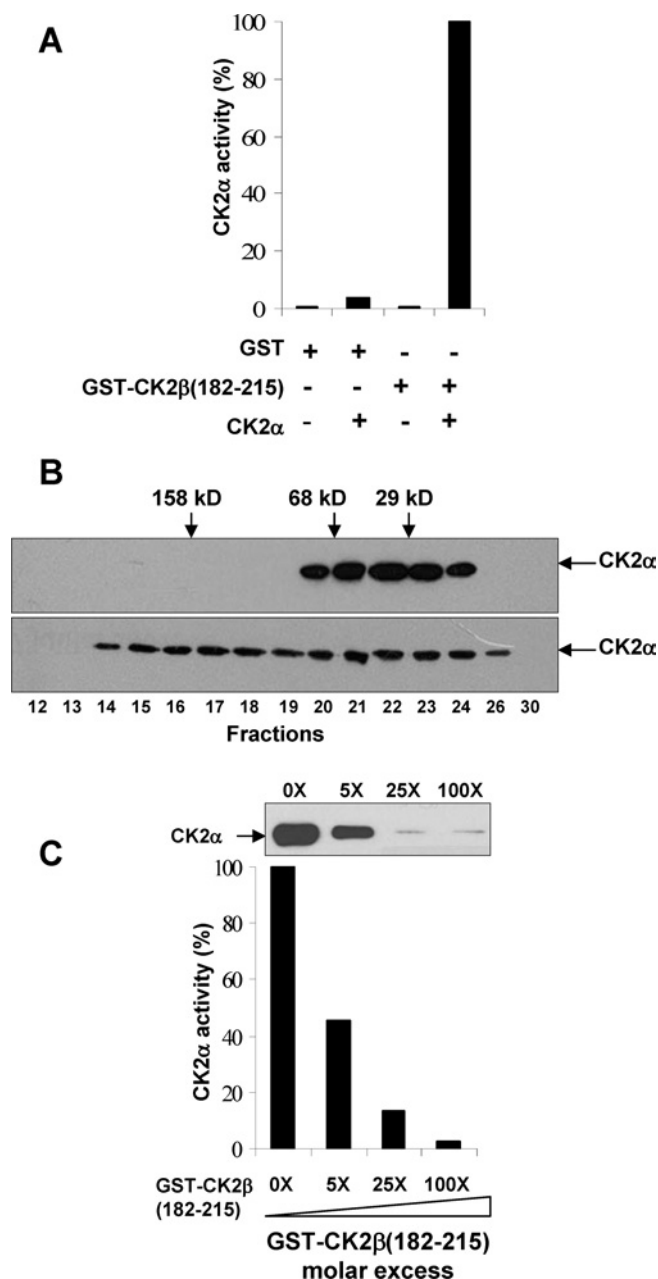
**Figure 1** Reversibility of the CK2 subunit assembly *in vitro*

(A) Exchange of CK2 $\alpha$  in the subunit complex. Pre-formed complexes between immobilized MBP-CK2 $\beta$  and [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  were incubated for 1 h with increasing concentrations of unlabelled CK2 $\alpha$ . After washing, the amount of [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  present in the complex was determined by radioactivity counting. (B) Kinetics of dissociation of the CK2 subunit complex. Pre-formed complexes between [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  and MBP-CK2 $\beta$  were incubated for different times with a 10-fold molar excess of unlabelled CK2 $\alpha$ . After washing, the amount of [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  remaining in the complex was determined by radioactivity counting. Results are the means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

CK2 $\alpha$ , the  $t_{1/2}$  of CK2 complex dissociation was evaluated to be  $\approx 38$  min, showing that, unlike the fast association of CK2 subunits ( $t_{1/2} = 1$  min), the kinetics of disassembly were rather slow (Figure 1B). These data are consistent with the association/dissociation rate constants determined previously [30].

#### Molecular and functional analysis of the CK2 $\beta$ C-terminus

Analysis of the crystal data has revealed the major contribution of the  $\alpha/\beta$  tail contact for the stability of the CK2 holoenzyme [13]. In addition, CK2 $\beta$  mutants in which the zinc-finger motif has been disrupted failed to dimerize and to recruit CK2 $\alpha$ , showing that this dimerization is essential for the proper docking of CK2 $\alpha$  [31,32]. A CK2 $\alpha$ -interacting domain was delineated by residues 181–203 in the CK2 $\beta$  C-terminus [33]. Thus we have expressed and purified from bacteria a CK2 $\beta$  fragment encompassing residues 182–215 fused to GST (GST- $\beta$  C-ter). Size-exclusion chromatography analysis indicated that this fusion protein behaves as a dimeric protein through GST–GST interaction (results not shown). Reconstitution experiments



**Figure 2** Interaction of a CK2 $\beta$  C-terminal fragment with CK2 $\alpha$

(A) Stable association of CK2 $\alpha$  with a GST- $\beta$  C-ter fragment. Agarose beads containing different GST-tagged proteins were incubated with or without CK2 $\alpha$  as indicated. After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was evaluated by a CK2 kinase assay as described in the Experimental section. (B) Size-exclusion chromatography of either free CK2 $\alpha$  (upper panel) or CK2 $\alpha$ –GST- $\beta$  C-ter complex (lower panel). Collected fractions were assayed for the presence of CK2 $\alpha$  by Western blotting. Elution of molecular mass standards is indicated (sizes are in kDa). (C) Antagonist effect of the GST- $\beta$  C-ter fragment. Immobilized MBP-CK2 $\beta$  was incubated with the indicated fold excess of GST- $\beta$  C-ter and a fixed amount of CK2 $\alpha$ . After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was assessed by a CK2 kinase assay and Western blotting.

showed that this mini-protein was sufficient for a productive high-affinity interaction with CK2 $\alpha$  in a pull-down assay (Figure 2A). Size-exclusion chromatography analysis showed that the free CK2 $\alpha$  was eluted as a monomer (42 kDa). In contrast, CK2 $\alpha$  incubated with GST- $\beta$  C-ter was eluted as free CK2 $\alpha$  as well as a CK2 $\alpha$ –GST- $\beta$  C-ter complex with an apparent molecular mass of 150 kDa (Figure 2B). These data indicate that this interaction

generates a stable heterocomplex bridging two catalytic subunits. Thus the region delineated by residues 182–215 in GST- $\beta$  C-ter contains an autonomous CK2 $\alpha$ -interacting domain. We then examined the effect of this CK2 $\beta$  domain on the formation of the CK2 holoenzyme complex in a solid-phase competition assay. As illustrated in Figure 2(C), the interaction between CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  was strongly impaired by the presence of increasing concentrations of the GST- $\beta$  C-ter protein. These results show that the 33-amino-acid C-terminal region of CK2 $\beta$  binds tightly to CK2 $\alpha$  and behaves as an antagonist of the CK2 subunit interaction.

### Identification and validation of CK2 $\beta$ hotspots for high-affinity CK2 $\alpha$ binding

The crystal structure of the CK2 holoenzyme has suggested the predominant contribution of specific residues for the interfacial contacts of the CK2 $\beta$  tail with CK2 $\alpha$ , which were localized in a cluster of hydrophobic amino acids centred around Tyr<sup>188</sup>. As already pointed out by Niefind et al. [13], this highly conserved segment of CK2 $\beta$  forms a structural element containing a  $\beta$ -hairpin loop with Tyr<sup>188</sup> at its top (Figure 3A). This analysis provided a general outline of the CK2 $\alpha$ -binding site, but did not identify experimentally the specific residues involved in the binding. Guided by the high-resolution structure of the CK2 holoenzyme, we used alanine mutagenesis to target CK2 $\beta$  residues (Met<sup>166</sup>, Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup>) in this CK2 $\alpha$ -docking site that make the most significant contacts with CK2 $\alpha$ . Residues within CK2 $\alpha$  that are involved in interactions with these CK2 $\beta$  residues are mainly hydrophobic residues such as Ile<sup>69</sup>, Pro<sup>104</sup>, Tyr<sup>39</sup>, Leu<sup>41</sup>, Val<sup>42</sup>, Ile<sup>57</sup>, Ile<sup>59</sup> and Val<sup>105</sup>. In addition, carbonyl oxygen of Tyr<sup>188</sup> and Lys<sup>191</sup> CK2 $\beta$  backbone are making hydrogen bonds with N $\epsilon$  of Gln<sup>36</sup> and Leu<sup>41</sup> of CK2 $\alpha$  respectively. However, it is known that the holoenzyme structure is stable under high ionic strength, suggesting that these hydrogen bonds may be barely involved in the subunit interaction [10]. Therefore we tested M166A, Y188A and F190A mutants by quantitative binding analysis. Figure 4(A) shows that the CK2 $\alpha$ -binding activity of the single mutant F190A (CK2 $\beta$ -F) was significantly reduced, and this activity was completely abrogated for the Y188A/F190A double mutant (CK2 $\beta$ -YF) and for the M166A/Y188A/F190A triple mutant (CK2 $\beta$ -MYF). To validate these data, the binding properties of the CK2 $\beta$  mutants were also analysed by surface plasmon resonance spectroscopy. As shown in Figure 4(B), the binding activity of the CK2 $\beta$ -F single mutant was markedly decreased, and the CK2 $\beta$ -YF double or the CK2 $\beta$ -MYF triple mutations virtually abolished interaction.

### Functional properties of CK2 $\beta$ mutants

Since it is clear that, in many cases, CK2 $\beta$  mediates the interaction between the catalytic subunits and its cellular substrates, thereby modulating their phosphorylation, we assumed that any mutation perturbing the CK2 subunit interaction would affect the phosphorylation of CK2 $\beta$ -dependent substrates. A functional analysis of wild-type CK2 $\beta$  and CK2 $\beta$ -M, CK2 $\beta$ -YF and CK2 $\beta$ -MYF mutants was performed, testing their effect on the CK2-mediated phosphorylation of CDC25B [34]. The data show that, although the phosphorylation of CDC25B was weakly affected in the presence of the single CK2 $\beta$ -M mutant, the double CK2 $\beta$ -YF and triple CK2 $\beta$ -MYF mutants were inefficient for CK2-mediated phosphorylation of CDC25B (Figure 5, lanes 1–5). Similarly, autophosphorylation of the CK2 $\beta$ -YF and CK2 $\beta$ -MYF mutants was strongly affected (Figure 5, lanes 6–9), indicating that these mutants are also defective for the supramolecular organization of the CK2 holoenzyme [35]. Thus Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup> represent key

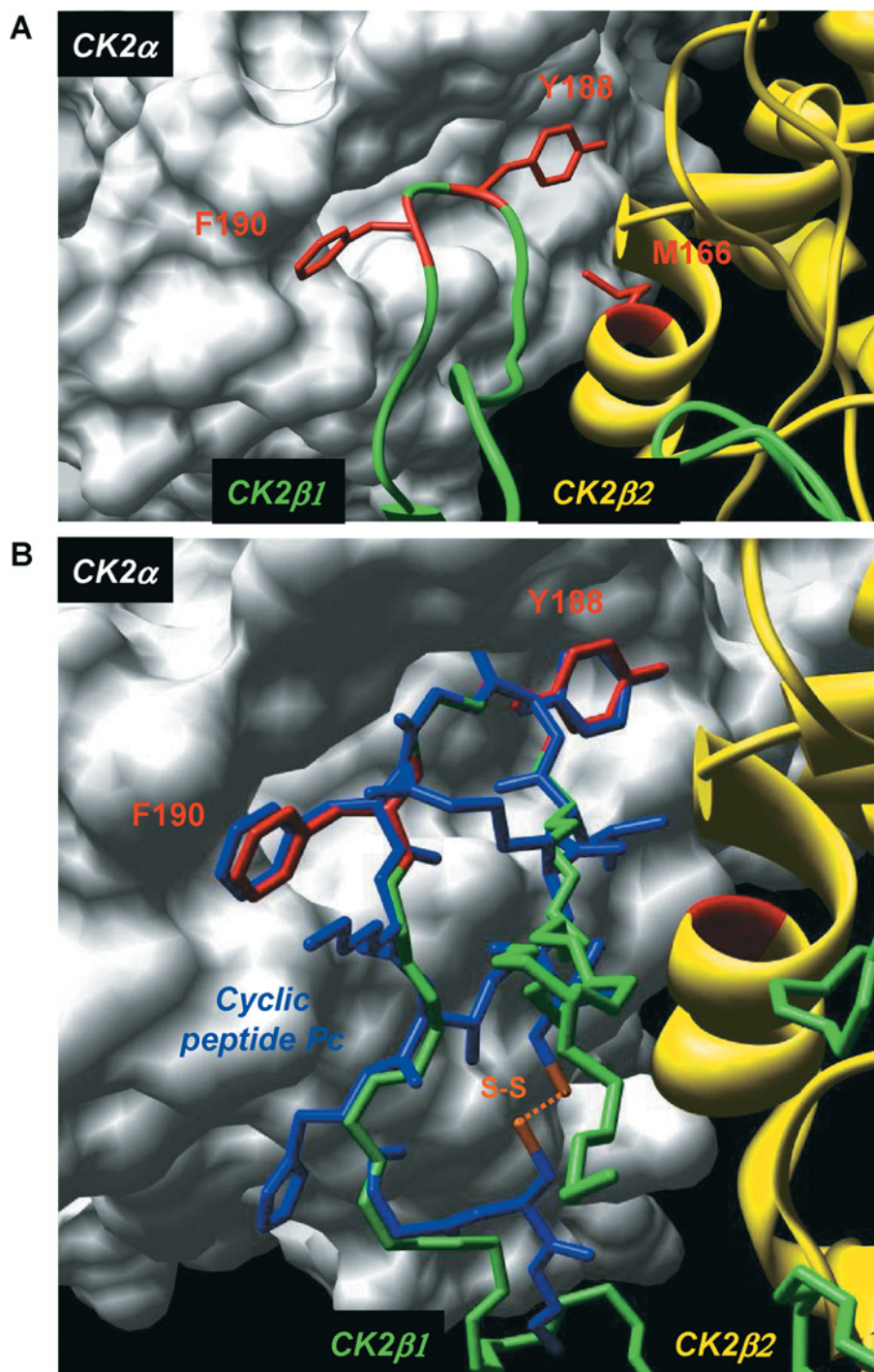
CK2 $\beta$  hotspot residues for a functional interaction with CK2 $\alpha$  *in vitro*.

### *In vivo* validation of CK2 $\beta$ hotspots

To visualize the CK2 subunit interaction in living cells, we applied a BiFC assay, which allows the investigation of interacting molecules *in vivo* [27]. The BiFC assay is based on the formation of a fluorescent complex by fragments of the EYFP brought together by the association of two interaction partners fused to non-fluorescent EYFP half-molecules. This approach enables visualization of the proteins interaction under conditions that closely reflect the normal physiological environment. Previous work from our laboratory has shown that visualization of CK2 subunit interaction by FRET (fluorescence resonance energy transfer) analysis required that the fluorochromes should be positioned on the N-terminal region of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  [36]. Thus the (1–154; YN) and (155–238; YC) fragments of EYFP were fused to the N-terminus of CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  or different CK2 $\beta$  mutants. The corresponding constructs were co-transfected in HeLa cells, and the BiFC assay was performed using immunostaining of EYFP to enhance the signal as described in the Experimental section (see also Supplementary Figure 1). Cells transfected with full-length EYFP fused to CK2 $\alpha$  (Figure 6A, panel a) or to CK2 $\beta$  (not shown) exhibit a strong fluorescence after EYFP immunostaining. As expected, cells separately transfected with YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  expression vectors (Figure 6A, panels b and c) or YN-CK2 $\beta$  and YC-CK2 $\alpha$  (not shown) did not exhibit any detectable fluorescence even after immunostaining. Co-transfection of YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  yielded reconstitution of EYFP upon specific binding in 36.8 % of the cells (Figures 6A, panel d, and 6B). When the fusion partners YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  were cross-exchanged, reconstitution was also observed (results not shown). Similarly, co-expression of YN-CK2 $\alpha$  and YC fused to CK2 $\beta$ -M, CK2 $\beta$ -Y or CK2 $\beta$ -F single mutants allowed the observation of a characteristic fluorescent signal (Figures 6A, panel e, and 6B). In contrast, a weak complementation (14.4 % of the cells above the fluorescence threshold) was observed with CK2 $\beta$ -YF double mutant, and EYFP reconstitution was barely detected (2.4 %) for YN fused to CK2 $\beta$ -MYF triple mutant (Figure 6A, panel f), despite strong protein expression as determined on immunoblots (Figure 6C, lanes 3 and 6). These results indicate that mutations of CK2 $\beta$  residues Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup> strongly influence the efficiency of bimolecular complex formation, supporting the hypothesis that their mutation inhibits interaction with CK2 $\alpha$  in the cellular context.

### Constrained cyclic peptides as antagonists of CK2 subunit interaction

The dramatic effects of the two hotspot mutants on CK2 $\beta$  binding observed both *in vitro* and in the cellular context suggest that the interaction domain could be narrowed down to a short contiguous sequence. The high-resolution structure of the CK2 holoenzyme has revealed that a cluster of well-defined hydrophobic residues present on the CK2 $\beta$  chain face hydrophobic residues located N-terminally at the outer surface formed by the juxtaposition of the antiparallel  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 sheets of CK2 $\alpha$  [13,37]. This cluster, which contains the identified hotspots Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup>, represents a segment of highly conserved residues (R<sup>186</sup>LYGFKIH<sup>193</sup>), exhibiting a specific structural feature: it points away from the protein core, and forms a 90°  $\beta$ -hairpin loop with Tyr<sup>188</sup> at its top which binds into a shallow hydrophobic groove present in the  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 sheets of CK2 $\alpha$  [13]. The interface relies on the steric complementarity

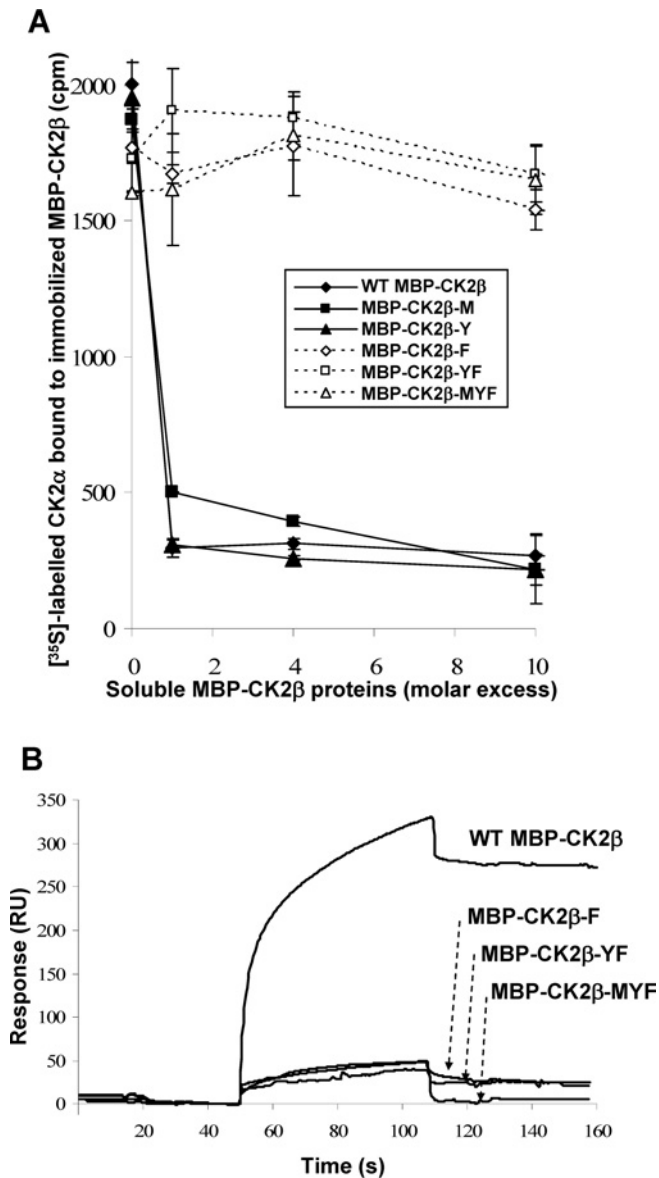


**Figure 3** Structure and mode of binding of Pc peptide on CK2 $\alpha$

(A) Surface representation of the binding pocket of CK2 $\alpha$  interacting with a short C-terminal loop of CK2 $\beta$ . Crystal structure of the CK2 holoenzyme shows that a C-terminal fragment of the CK2 $\beta$ 1 chain encompassing residues 186–193 (green) forms a loop inserting into a deep hydrophobic pocket of CK2 $\alpha$  [14]. Surface representation of the CK2 $\alpha$  cleft in grey highlights its pocket-like characteristics. The phenyl and phenol rings of the two non-polar and aromatic CK2 $\beta$  residues Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup> respectively (red) are in quasi-planar opposite orientation and fit tightly into it. Met<sup>166</sup> (red) located on the second CK2 $\beta$ 2 chain (yellow) is labelled. (B) Molecular model of Pc peptide in CK2 $\alpha$  pocket. A rough molecular model of Pc peptide (blue) was obtained from the CK2 $\beta$ 1 structure determined previously (PDB code 1JWH [13]). In detail, the CK2 $\beta$ 1 structure segment (R<sup>186</sup>LYGFKIH<sup>193</sup> in green) was taken as template for the corresponding central peptide segment, and the terminal amino acids were added manually using the program Coot [39]. A basic geometric idealization of peptide bonds was then performed using the program Refmac 5 [40] from CCP4 [41]. For clarity, only key interacting residues of CK2 $\beta$ 1 are shown (in red). The cysteine disulfide bridge is coloured orange. The superimposition of Pc peptide with the CK2 $\beta$  C-terminal loop demonstrates that Pc emulates the interaction of the natural ligand CK2 $\beta$  with CK2 $\alpha$ . Figures were prepared with the Chimera software [42] and the 1JWH PDB structure [14].

between this CK2 $\alpha$  groove and the hydrophobic face of the CK2 $\beta$  hairpin loop and, in particular, on a triad of CK2 $\beta$  amino acids, Tyr<sup>188</sup>, Gly<sup>189</sup> and Phe<sup>190</sup>, which inserts deep into

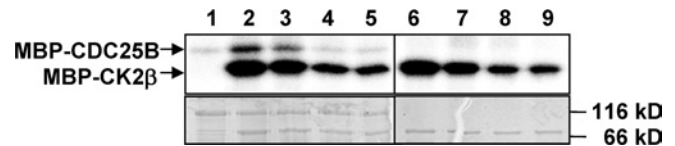
the CK2 $\alpha$  groove (Figure 3A). To assess whether peptides derived from this CK2 $\beta$  region could antagonize the CK2 subunit interaction, we developed a binding assay in which MBP–CK2 $\beta$



**Figure 4** CK2 $\alpha$ -binding activity of CK2 $\beta$  mutant proteins

(A) Solid-phase CK2 $\alpha$ -binding assay of different CK2 $\beta$  mutants. Immobilized wild-type (WT) CK2 $\beta$  was incubated with [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  in the presence of increasing concentrations of soluble wild-type MBP-CK2 $\beta$  or MBP-CK2 $\beta$  mutants as indicated. After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was evaluated by radioactivity counting. Results are the means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). (B) Real-time binding kinetics between immobilized GST-CK2 $\alpha$  and different MBP-CK2 $\beta$  mutant proteins measured by surface plasmon resonance. The interaction between immobilized GST-CK2 $\alpha$  and MBP-CK2 $\beta$  mutants was recorded as described in the Experimental section. RU, response units.

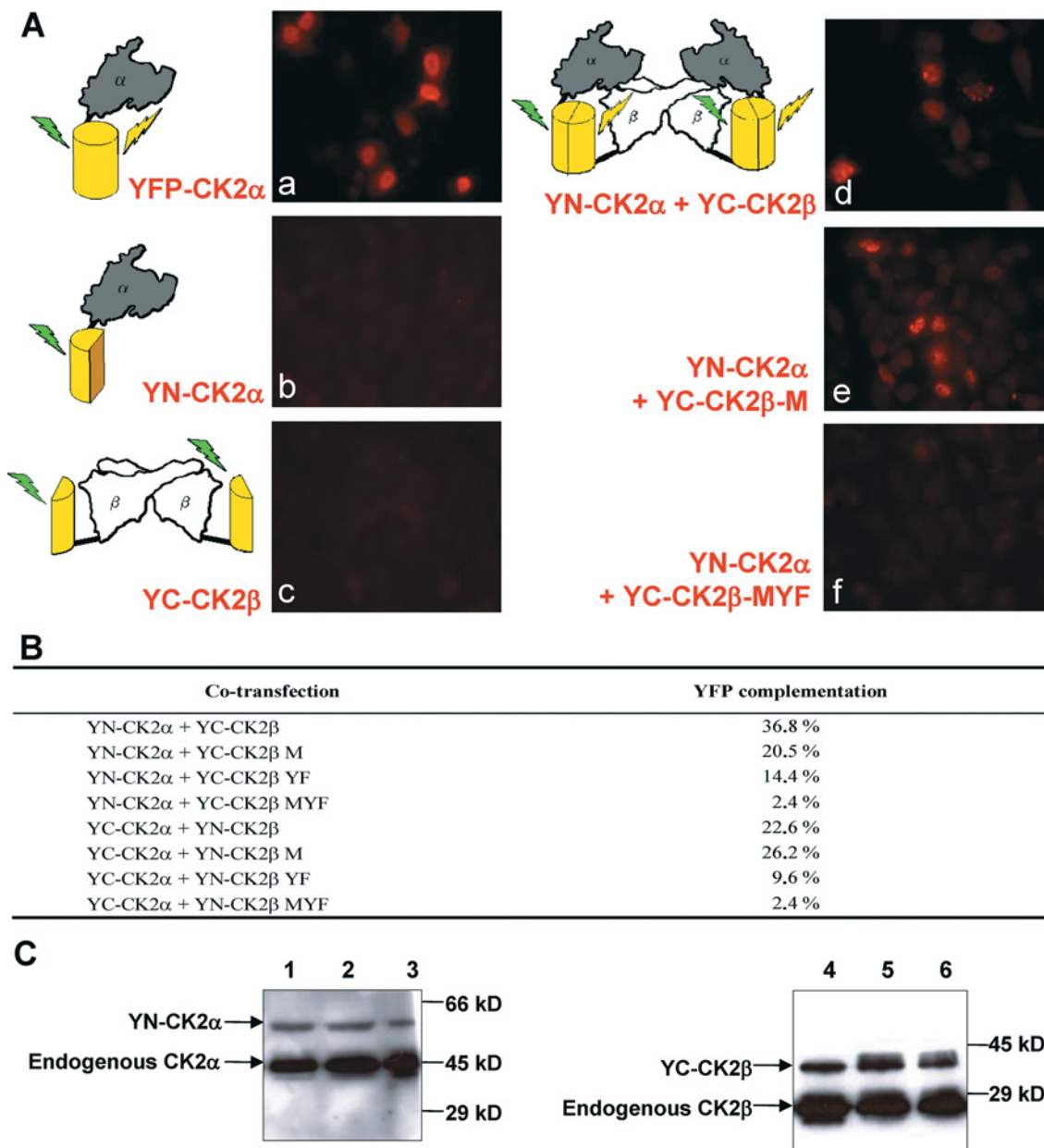
was bound on streptavidin-coated microtitre plates and incubated with [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$ . Compounds that disrupt the CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  complex thus show reduced radioactivity relative to the background. We then used the X-ray structure of CK2 $\beta$  in the holoenzyme complex as a template for the design of conformationally constrained peptides derived from the CK2 $\beta$  C-terminal domain and centred around the Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup> hotspots. An eight-residue peptide (Arg<sup>186</sup>-His<sup>193</sup>) which contained the cluster of hydrophobic residues (Leu<sup>187</sup>, Tyr<sup>188</sup> and Ile<sup>192</sup>) and three additional glycine residues was cyclized via two cysteine residues to 'staple' its conformation and to mimic the binding face of CK2 $\beta$  with CK2 $\alpha$  (Figure 3B). The biological



**Figure 5** Phosphorylation of CDC25B by CK2 $\alpha$  in presence of CK2 $\beta$  or CK2 $\beta$  mutants

MBP-CDC25B (1.5  $\mu$ M) was pre-incubated for 15 min with CK2 $\alpha$  (0.6  $\mu$ M) in the presence of 0.35  $\mu$ M of wild-type MBP-CK2 $\beta$  or the indicated MBP-CK2 $\beta$  mutants. Phosphorylation reaction was carried out for 5 min at room temperature in the presence of 25  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP/MgCl<sub>2</sub>. Phosphorylated proteins were separated by SDS/PAGE and analysed by autoradiography (upper panel) or Coomassie Blue staining (lower panel). Lane 1, CDC25B; lane 2, wild-type MBP-CK2 $\beta$  + CDC25B; lane 3, MBP-CK2 $\beta$ -M + CDC25B; lane 4, MBP-CK2 $\beta$ -YF + CDC25B; lane 5, MBP-CK2 $\beta$ -MYF + CDC25B; lane 6, wild-type MBP-CK2 $\beta$ ; lane 7, MBP-CK2 $\beta$ -M; lane 8, MBP-CK2 $\beta$ -YF; lane 9, MBP-CK2 $\beta$ -MYF. Molecular masses are indicated in kDa.

activity of this peptide, referred to as Pc peptide, was first examined in a CK2 $\alpha$  pull-down assay. Figure 7(A) shows that the same amount of CK2 $\alpha$  activity could be found associated with biotinylated CK2 $\beta$  or biotinylated Pc, indicating that this cyclic peptide stably interacts with CK2 $\alpha$ . This interaction could be also visualized by surface plasmon resonance spectroscopy (results not shown). To assess whether the Pc peptide could antagonize the CK2 subunit interaction, a CK2 subunit binding assay was performed in the presence of increasing concentrations of Pc peptide. Representative results are shown in Figure 7(B). The presence of the Pc peptide strongly antagonized the formation of the CK2 complex ( $IC_{50} = 3 \mu$ M). Importantly, an almost complete disassembly of the pre-formed complex was observed in the presence of the Pc peptide ( $IC_{50} = 6.5 \mu$ M). The effect of varying the length from eight to 14 amino acids in a series of head-to-tail cyclized peptide analogues was examined. Although all length variants significantly blocked the interaction, the 11-residue Pc peptide was the most effective (Figure 7C). Noteworthy, a linear form of Pc was much less active in this binding assay ( $IC_{50} = 30 \mu$ M), and a linear form of Pc with an inverted sequence was without effect, showing that both the sequence and the constrained conformation of the peptide are essential for its antagonist activity. To explore the functional impact of each amino acid side chain on the Pc peptide antagonist activity, we synthesized a series of cyclic peptides in which each amino acid in the sequence RLYGFKIH was subjected to a systematic single-site replacement strategy. These derivatives were first tested at two fixed peptide concentrations (1.5 and 15  $\mu$ M) in the CK2 subunit interaction assay. As shown in Figure 8(A), the largest effects of single alanine mutants were observed for residues Phe<sup>7</sup> or Gly<sup>6</sup> and to a lesser extent for residues Tyr<sup>5</sup> and Ile<sup>9</sup>. Alanine substitutions of neighbouring positions (Arg<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>, Lys<sup>8</sup> and His<sup>10</sup>) caused marginal reductions in binding, indicating that these residues serve a more passive role. Quantitative determination of the  $IC_{50}$  values shows further that the most disruptive alanine substitutions are confined in a small patch that extends from Tyr<sup>5</sup> to Phe<sup>7</sup>, and the largest reduction in binding was for Phe<sup>7</sup> (Figure 8B). In accord with the definition of the corresponding CK2 $\beta$  hotspots, these data highlight the importance of these residues for the biological activity of peptide Pc. A functional analysis of this peptide was performed testing its effect on the phosphorylation of the Olig-2 transcription factor, which is catalysed exclusively by the tetrameric form of CK2 (T. Buchou, personal communication). Figure 9 shows that the presence of increasing concentrations of Pc led to a strong decrease of the original Olig-2 phosphorylation, reflecting a



**Figure 6 Visualization of interactions between CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  or CK2 $\beta$  mutants in living cells by BiFC**

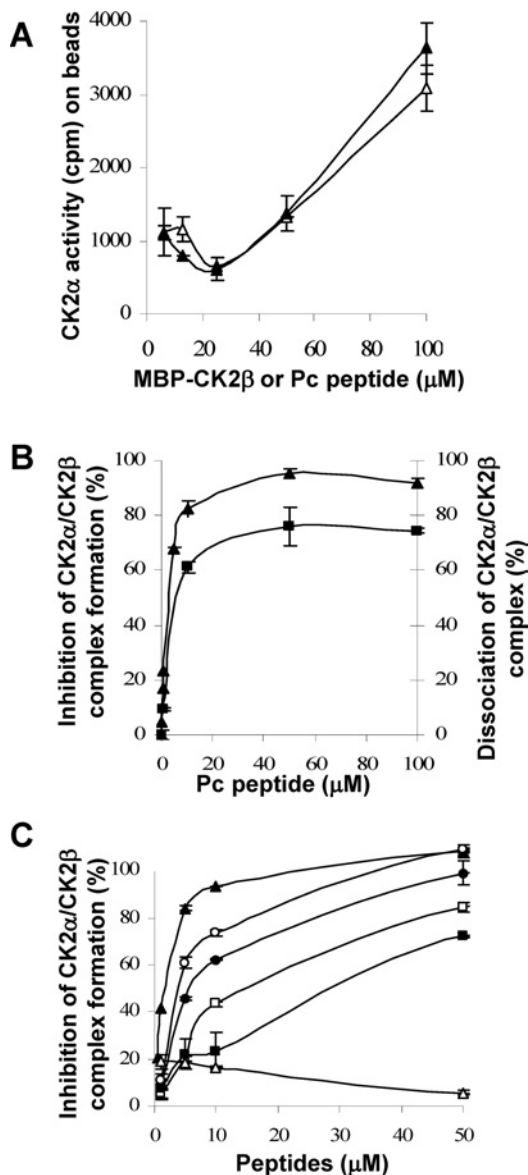
(A) Immunofluorescence images of HeLa cells transfected with plasmids expressing the EYFP fragments fused to CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  or CK2 $\beta$  mutants as indicated in each panel. At 24 h after transfection, immunostaining of EYFP was performed to enhance the signal as described in the Experimental section. The schematic diagrams on the left of the images represent the experimental strategies used. (B) Quantification of the BiFC signal in cells co-transfected with different plasmid constructs. Results are expressed as the percentage of cells that were above the fluorescence threshold observed in cells expressing only YN-CK2 $\alpha$  or YN-CK2 $\beta$ . (C) Western blot analysis of the levels of protein expression. Cells corresponding to panels d, e and f in (A) that expressed the indicated proteins were harvested, and the cell extracts were analysed by Western blotting using anti-CK2 $\alpha$  (lanes 1–3) and CK2 $\beta$  (lanes 4–6) antibodies. Lanes 1 and 4, YN-CK2 $\alpha$  + wild-type YC-CK2 $\beta$ ; lanes 2 and 5, YN-CK2 $\alpha$  + YC-CK2 $\beta$ -M; lanes 3 and 6, YN-CK2 $\alpha$  + YC-CK2 $\beta$ -MYF. Molecular masses are indicated in kDa.

Pc-induced progressive dissociation of the catalytically active CK2 holoenzyme complex.

## DISCUSSION

The irreversible nature of the CK2 holoenzyme formation has been challenged by both its crystal structure and live-cell imaging studies [13,16]. Free populations of each CK2 subunit have been identified in several organs [17], and differential subcellular localizations have also been reported for CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ . In

many cases, CK2 $\beta$  operates as a docking platform affecting the accessibility of the catalytic site for binding substrates [15]. From a structural point of view, the CK2 $\beta$  subunit can provide CK2 specificity by either shielding a substantial surface of the CK2 $\alpha$  subunit or, at the same time, providing a new surface near the catalytic active site. Since the free catalytic subunit and the holoenzyme exhibit divergent substrate preferences, it could be predicted that such a balance is crucial in the control of the many cellular processes that are governed by this multifaceted enzyme [19].



**Figure 7** Disruption of CK2 subunit interaction by CK2 $\beta$ -derived cyclic peptides

(A) Binding of Pc peptide or CK2 $\beta$  to CK2 $\alpha$ . Increasing concentrations of biotinylated Pc peptide (▲) or biotinylated MBP-CK2 $\beta$  (△) were immobilized on streptavidin beads and incubated with CK2 $\alpha$  (0.3  $\mu$ M) for 15 min at 4 °C. After washing, the amount of associated CK2 $\alpha$  was evaluated by a CK2 kinase assay. (B) Inhibition of CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  complex formation by Pc peptide (▲). Immobilized MBP-CK2 $\beta$  was incubated with increasing concentrations of Pc peptide, followed by the addition of [<sup>35</sup>S]methionine-labelled CK2 $\alpha$  (10<sup>5</sup> c.p.m.). After washing, bound CK2 $\alpha$  was determined by radioactivity counting. Dissociation of pre-formed CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  complex by Pc peptide (■). [<sup>35</sup>S]Methionine-labelled CK2 $\alpha$  was incubated with immobilized MBP-CK2 $\beta$ , followed by the addition of increasing concentrations of Pc peptide. After washing, bound CK2 $\alpha$  was determined by radioactivity counting. (C) Inhibition of CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  complex formation by different Pc peptide derivatives. Increasing concentrations of the different peptides were tested as in (B). Pc (▲), linear peptide GAGGRLYGFKIHGGP (■), inverted linear peptide PGGHIKFGYLRGGAG (△), head-to-tail peptide analogues: PcL1 RLYGFKIHGPAGG (□), PcL2 RLYGFKIHGPAGG (●) and PcL3 RLYGFKIHGGPGAGG (○). Results are the means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

In the present study, we have shown that the CK2 holoenzyme complex is subject to disassembly and reassembly *in vitro*. The rather low rate of dissociation of the holoenzyme complex *in vitro* might not reflect the situation in intact cells, where interacting partners could induce conformational changes, shifting the

balance in favour of the dissociation [19]. A relatively small portion of CK2 $\beta$  encompassing the 33-residue C-terminal region constitutes a minimum CK2 $\alpha$ -binding domain which is necessary and sufficient for high-affinity interaction with CK2 $\alpha$ . The CK2 holoenzyme crystal structure has revealed that several residues in this domain make significant contacts with CK2 $\alpha$ . On the basis of these data, the finding that emerges from our mutagenesis study is that only a small set of primary hydrophobic contacts at the centre of the interface dominates affinity *in vitro*, allowing the identification of Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup> as the most important interaction points of CK2 $\beta$ . Mutations of these residues had strong functional consequences, since the CK2 $\beta$ -YF and CK2 $\beta$ -MYF mutants were (i) unable to sustain the formation of a stable CK2 complex, (ii) defective for its supramolecular organization, and (iii) inefficient for CK2-mediated phosphorylation of a CK2 $\beta$ -dependent substrate such as CDC25B.

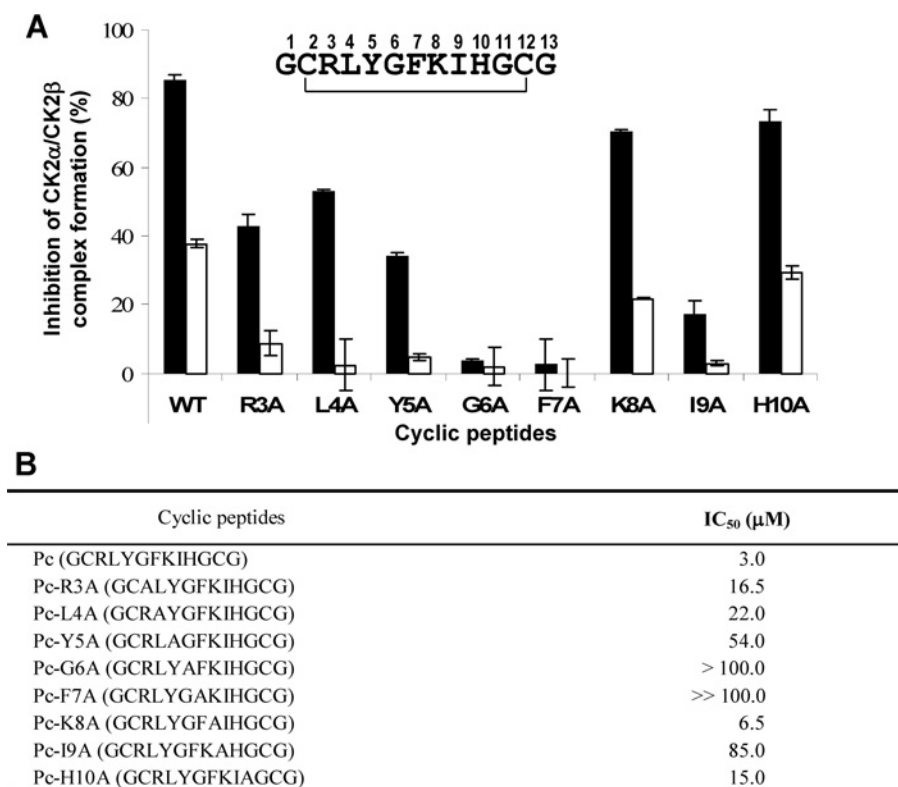
BiFC analysis of YN-CK2 $\alpha$  and YC-CK2 $\beta$  reproducibly demonstrated a specific interaction, whereas the individual tagged proteins did not yield fluorescence. A characteristic BiFC pattern was detected with CK2 $\beta$ -M, CK2 $\beta$ -Y and CK2 $\beta$ -F single mutants, indicating that these CK2 $\beta$  mutants mediate CK2 $\alpha$  recognition. In contrast, BiFC fluorescence could be monitored only at a very low intensity with the CK2 $\beta$ -YF double mutant, demonstrating that these two amino acids are essential for a productive complex formation in the normal cellular environment. These observations, which corroborated our *in vitro* quantitative binding analysis, were supportive of the ability to design peptides that can affect the CK2 subunit interaction. This led us to a structure-based design of CK2 $\beta$ -derived conformationally constrained peptides that can efficiently antagonize this high-affinity interaction. Among a series of cyclic peptides, the disulfide-bridged Pc peptide was the most active peptide variant. This cyclic peptide was considerably more potent than its identical linear form, indicating that cyclization staples the peptide in a fixed conformation, a strategy that is known to strongly enhance peptide affinity for their target by limiting flexibility and multiple conformational changes [38]. Consistent with the identification of Tyr<sup>188</sup> and Phe<sup>190</sup> as CK2 $\beta$  hotspots, alanine-scanning analysis has confirmed that change of these two hydrophobic residues was highly detrimental for the inhibitory activity of the Pc peptide.

#### Potential biological relevance of CK2 subunit antagonists

To our knowledge, the 11-mer peptide Pc represents the first small antagonist that binds to the CK2 interface and inhibits its high-affinity subunit interaction. Functional analysis showed that Pc could act as an antagonist of CK2 $\beta$ -dependent phosphorylation through the inhibition/disruption of the CK2 holoenzyme complex. Structural modifications of this cyclic peptide, such as attachment to cell-permeant adducts, will be required to confer *in vivo* activity. Future efforts should also focus on the design of peptidomimetics with enhanced activity and selectivity.

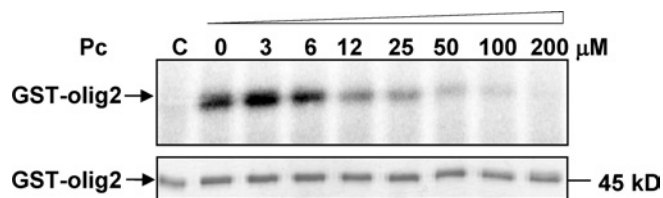
Alternatively, the present study indicates further that it should be possible to obtain small molecules that bind to the CK2 $\alpha$  hydrophobic groove and inhibit its interaction with CK2 $\beta$  in a manner similar to the Pc peptide. Molecules that selectively inhibit the CK2 subunit interaction would be useful in determining the importance of CK2 $\beta$  in the control of the many cellular processes that are governed by this multifunctional kinase. In particular, such inhibitors would provide more rapid and reversible tools than siRNA (small interfering RNA) or overexpression methods for correctly identifying relevant CK2 $\beta$ -dependent substrates. They will also serve as leads for the rational design of function-specific drugs that disrupt some actions of CK2, but leave others intact, allowing the deregulation of specific intracellular pathways.





**Figure 8** Antagonist effects of peptide Pc variants carrying single-site mutations

(A) Various Pc peptide variants generated by alanine scanning were tested at 1.5 (□) or 15 (■) μM for their antagonist effect on the association of CK2 subunits as described in Figure 7(C). Results are the means ± S.D. ( $n=3$ ) of a representative experiment. WT, wild-type. (B) IC<sub>50</sub> values determined for each peptide variant.



**Figure 9** Antagonist effect of Pc peptide on CK2-mediated phosphorylation of a CK2 $\beta$ -dependent substrate

Pre-formed CK2 complexes were incubated for 15 min at 4 °C with increasing concentrations of Pc peptide, followed by the addition of GST-Olig2 (5 μg) and 25 μM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP/MgCl<sub>2</sub> for 5 min at room temperature. Phosphorylated proteins were separated by SDS/PAGE and analysed by autoradiography (upper panel) or Coomassie Blue staining (lower panel). The results are representative of two independent experiments. C, control without CK2. The molecular mass of the 45 kDa protein is indicated.

Furthermore, selective disruption of the CK2 $\alpha$ -CK2 $\beta$  interaction could find important applications to test pharmacologically the importance of this interaction in tumour cell growth. With the help of structure-based rational design, the idea of finding small molecules with significantly higher affinities for CK2 $\alpha$  using the Pc peptide as a lead molecule does not seem far-fetched.

We thank Thierry Buchou for providing recombinant GST-Olig2, Jean-Baptiste Raiser (Cristallographie des Protéines, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) for assistance in molecular modelling, Nicole Thielens (Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) for assistance with BIAcore and Bernard Ducommun (CNRS UMR5088, Université Paul Sabatier, Toulouse, France) for providing recombinant CDC25B. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée 2007), the Institut National du Cancer

(grant number 57) and by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université Joseph Fourier (UJF). We also acknowledge the Plateau de Synthèse de la Plate-Forme Chimie Nanobio and the Ministère de la Recherche for grant number 15432-2004 to V.D.

## REFERENCES

- Andreeva, I. E., Livanova, N. B., Eronina, T. B., Silonova, G. V. and Poglazov, B. F. (1986) Phosphorylase kinase from chicken skeletal muscle: quaternary structure, regulatory properties and partial proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **158**, 99–106
- Gibson, R. M., Ji-Buechler, Y. and Taylor, S. S. (1997) Interaction of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase: electrostatic sites on the type I $\alpha$  regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 16343–16350
- Nigg, E. A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* **17**, 471–480
- Hsu, H. L., Yannone, S. M. and Chen, D. J. (2002) Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair* **1**, 225–235
- Dyck, J. R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C. S., Kemp, B. E. and Witters, L. A. (1996) Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.* **271**, 17798–17803
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK- $\gamma$  is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* **395**, 297–300
- Gibson, R. M. and Taylor, S. S. (1997) Dissecting the cooperative reassociation of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase: role of Trp-196 in the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 31998–32005
- Pinna, L. A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell Sci.* **115**, 3873–3878
- Allende, J. E. and Allende, C. C. (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**, 313–323
- Litchfield, D. W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **369**, 1–15
- Hu, E. and Rubin, C. S. (1990) Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic ( $\alpha$ ) subunit of *Caenorhabditis elegans* casein kinase II in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 20609–20615

- 12 Grankowski, N., Boldyreff, B. and Issinger, O. G. (1991) Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits  $\alpha$  and  $\beta$  from bacteria. *Eur. J. Biochem.* **198**, 25–30
- 13 Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. and Issinger, O. G. (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* **20**, 5320–5331
- 14 Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. and Dideberg, O. (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.* **18**, 2930–2940
- 15 Bibby, A. C. and Litchfield, D. W. (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 $\beta$ . *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 67–79
- 16 Filhol, O., Nueda, A., Martel, V., Gerber-Scokaert, D., Benitez, M. J., Souchier, C., Saoudi, Y. and Cochet, C. (2003) Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 975–987
- 17 Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B. and Issinger, O. G. (1999) Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 $\beta$  subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 $\alpha$  subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett.* **462**, 353–357
- 18 Li, X., Guan, B., Maghami, S. and Bieberich, C. J. (2006) NKX3.1 is regulated by protein kinase CK2 in prostate tumor cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3008–3017
- 19 Filhol, O., Martiel, J. L. and Cochet, C. (2004) Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep.* **5**, 351–355
- 20 Allende, C. C. and Allende, J. E. (1998) Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30–31**, 129–136
- 21 Berg, T. (2003) Modulation of protein–protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2462–2481
- 22 Chene, P. (2006) Drugs targeting protein–protein interactions. *ChemMedChem* **1**, 400–411
- 23 Renaudet, O. and Dumy, P. (2003) Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **5**, 243–246
- 24 Heriche, J. K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M. and Goldberg, Y. (1997) Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 $\alpha$ . *Science* **276**, 952–955
- 25 Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Sarrouilhe, D., Loue-Mackebach, P., Chambaz, E. M. and Cochet, C. (1999) Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2 $\beta$  subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 43–50
- 26 Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N. and Chambaz, E. M. (1991) Coexpression of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* **30**, 11133–11140
- 27 Hu, C. D. and Kerppola, T. K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* **21**, 539–545
- 28 Kerppola, T. K. (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 449–456
- 29 Martel, V., Filhol, O., Colas, P. and Cochet, C. (2006) p53-dependent inhibition of mammalian cell survival by a genetically selected peptide aptamer that targets the regulatory subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **25**, 7343–7353
- 30 Martel, V., Filhol, O., Nueda, A. and Cochet, C. (2002) Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **973**, 272–277
- 31 Canton, D. A., Zhang, C. and Litchfield, D. W. (2001) Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2 $\beta$ . *Biochem. J.* **358**, 87–94
- 32 Filhol, O., Benitez, M. J. and Cochet, C. (2005) A zinc ribbon motif is essential for the formation of functional tetrameric protein kinase CK2. In *Zinc Finger Proteins: from Atomic Contact to Cellular Function* (Iuchi, S. and Kuldell, N., eds.), pp. 124–129, Landes Biosciences, Austin
- 33 Marin, O., Meggio, F., Sarno, S. and Pinna, L. A. (1997) Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2  $\beta$ -subunit. *Biochemistry* **36**, 7192–7198
- 34 Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. and Baldin, V. (2003) Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene* **22**, 220–232
- 35 Pagano, M. A., Sarno, S., Poletto, G., Cozza, G., Pinna, L. A. and Meggio, F. (2005) Autophosphorylation at the regulatory  $\beta$  subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 23–29
- 36 Theis-Febvre, N., Martel, V., Laudet, B., Souchier, C., Grunwald, D., Cochet, C. and Filhol, O. (2005) Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 15–22
- 37 Ermakova, I., Boldyreff, B., Issinger, O. G. and Niefind, K. (2003) Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J. Mol. Biol.* **330**, 925–934
- 38 Leduc, A. M., Trent, J. O., Wittliff, J. L., Bramlett, K. S., Briggs, S. L., Chirgadze, N. Y., Wang, Y., Burris, T. P. and Spatola, A. F. (2003) Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 11273–11278
- 39 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- 40 Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F. and Murshudov, G. N. (2004) REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2184–2195
- 41 Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
- 42 Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612

Received 21 June 2007/22 August 2007; accepted 23 August 2007

Published as BJ Immediate Publication 23 August 2007, doi:10.1042/BJ20070825