



HAL
open science

Conception et synthèse de nouveaux glycoclusters biologiquement actifs

Isabelle Bossu

► **To cite this version:**

Isabelle Bossu. Conception et synthèse de nouveaux glycoclusters biologiquement actifs. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV068 . tel-00680067

HAL Id: tel-00680067

<https://theses.hal.science/tel-00680067v1>

Submitted on 17 Mar 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Isabelle BOSSU

Thèse dirigée par **Pascal DUMY** et
codirigée par **Olivier RENAUDET**

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

Conception et synthèse de nouveaux glycoclusters biologiquement actifs

Thèse soutenue publiquement le **1^{er} décembre 2011**,
devant le jury composé de :

Mr. Pascal DUMY

Professeur, Université de Grenoble, Membre

Mr. Sébastien FORT

Chargé de recherche, Université de Grenoble, Membre

Mr. Benoit FRISCH

Directeur de recherche, Université de Strasbourg, Président

Mr. Alberto MARRA

Professeur, Université de Ferrara, Italie, Rapporteur

Mr. Olivier RENAUDET

Docteur, Université de Grenoble, Membre

Mr. Gilles SUBRA

Professeur, Université de Montpellier, Rapporteur



REMERCIEMENTS

Mon travail de thèse a été effectué au sein du département de chimie moléculaire dans l'équipe d'Ingénierie et d'Interactions Biomoléculaire (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, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse au sein d'une structure dynamique à l'interface des domaines de chimie et de biologie. Il m'a permis ainsi d'acquérir sous sa direction des connaissances scientifiques approfondies dans des domaines inconnus à mon arrivée.

Je remercie plus particulièrement le Dr. Olivier RENAUDET pour son encadrement quotidien et sa disponibilité afin de me transmettre toute sa connaissance de la chimie des peptides et des sucres particulièrement délicate à maîtriser. Je le remercie également de m'avoir permis de me rendre à plusieurs reprises dans de nombreux congrès qui ont contribué à mon ouverture d'esprit dans de nouveaux domaines d'application.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail :

- Mr Alberto MARRA, *professeur à l'université de Ferrara, Italie,*
- Mr Gilles SUBRA, *professeur à l'université de Montpellier,*
- Mr Sébastien FORT, *chargé de recherche à l'université de Grenoble,*
- Mr Benoit Frisch, *directeur de recherche à l'université de Strasbourg.*

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Dr. Nathalie Berthet qui m'a encadré et formé pour la réalisation des tests biologiques que j'ai réalisés dans le cadre de ce travail grâce à sa précieuse aide. Je la remercie très chaleureusement et amicalement pour m'avoir accueillie dans son bureau pour la dure période de rédaction de ce manuscrit et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles en me réconfortant avec des pauses thés et chocolat. Cette cohabitation aura été un joyeux moment de rigolade à conserver dans les souvenirs.

Bien sûr, je remercie particulièrement mes collègues et amis qui m'ont soutenu, aidé et par fois supporté en tant que Madame Autoritaire pendant ces trois années de thèse. Je pense tout particulièrement à Mr Bonnet et Mimi qui se reconnaîtront. Je vous souhaite bon courage

pour cette fin de thèse...Je serais encore là pour vous écouter dans les moments de désespoir comme toujours...Baptiste, mon successeur, tu accompliras de grandes choses pendant ces trois ans, tu es bien parti,

tiens le cap moussaillon. Michaël, cela a été un plaisir de t'aider pendant cette première année où nous nous sommes croisés à la paillasse. Et merci encore à tous pour les cadeaux que vous avez trouvés pour ma soutenance, je ris beaucoup en lisant le livre de blagues de blondes...Je remercie aussi Mathieu, Julien, Pierre et Marie-Laure qui m'ont accueilli lorsque j'étais nouvelle grenobloise, la dijonnaise Morgane et tous mes stagiaires qui m'ont aidé dans ce travail et bien fait rigoler.

Un dernier remerciement spécial pour mes amies secrétaires pour les pauses déjeuners et café bien rigolotes et leur aide dans de nombreuses situations. Une pensée très particulière pour mon amie Régine...Merci pour son soutien, sa présence chaleureuse et lumineuse et pour nos séances de courses à pied qui m'en ont fait voir mais que cela fait du bien !!

Finalement, je tiens à remercier avec tout mon amour Laurent qui a partagé ces trois longues années de thèse et pour sa présence tendre et apaisante au quotidien. Je remercie tous mes amis et ma famille qui m'ont soutenu et écouté durant ce travail de thèse et particulièrement mes parents avec tout mon amour.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| I. Introduction | 14 |
| I.1. Les glycoconjugués | 14 |
| I.2. Les interactions sucre/protéines | 16 |
| I.2.1. Définition | 16 |
| I.2.2. Les interactions monovalentes | 16 |
| I.2.3. Liaisons hydrogènes..... | 17 |
| I.2.4. Contacts hydrophobes | 17 |
| I.2.5. Le rôle des cations | 18 |
| I.3. Les interactions multivalentes | 18 |
| I.4. Structure de glycoconjugués multivalents..... | 20 |
| I.4.1. Les dendrimères | 21 |
| I.4.2. Les châssis polymériques cycliques : cyclodextrines et calixarènes | 26 |
| I.4.3. Les sucres comme plateforme de présentation | 34 |
| I.4.4. Les polymères | 36 |
| I.4.5. Oligomères linéaires à bases azotées ou peptidiques..... | 38 |
| I.4.6. Glycoliposomes..... | 42 |
| I.4.7. Les nanoparticules et nanotubes de carbone fonctionnalisées | 43 |
| I.4.8. Les cyclopeptides..... | 47 |
| I.4.9. Applications | 48 |
| I.5. Objectifs des travaux réalisés | 50 |
| II. Chapitre 1 : Stratégies de synthèse de glycoclusters | 54 |
| II.1. Les méthodes de ligation chimiosélectives | 55 |
| II.1.1. La cycloaddition de Huisgen | 57 |
| II.1.2. La formation du lien oxime..... | 60 |
| II.2. Synthèse des unités osidiques modifiés | 61 |
| II.2.1. Les sucres oxyamines | 62 |
| a. Synthèse du dérivé α -mannose oxyamine | 66 |
| b. Synthèse du β -galactose oxyamine | 60 |
| c. Synthèse du β -lactose oxyamine | 61 |
| d. Synthèse du α/β -Fucose oxyamine..... | 61 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| e. | Synthèse de l'antigène osidique Tn oxyamine | 62 |
| f. | Synthèse de l'antigène osidique TF oxyamine..... | 63 |
| II.2.2. | Les sucres propargylés | 69 |
| II.3. | Synthèse des glycoclusters | 71 |
| II.3.1. | Assemblage par stratégie oxime | 73 |
| a. | Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre aldéhydes | 73 |
| b. | Assemblage des glycoclusters tétravalents | 74 |
| c. | Synthèse de glycoclusters hexavalents..... | 75 |
| II.3.2. | Assemblage de glycoclusters par une stratégie d'assemblage par « double oxime » 76 | |
| a. | Synthèse des dendrimères de lysines modifiés | 77 |
| b. | Synthèse de châssis moléculaires à deux domaines | 78 |
| c. | Synthèse des glycoclusters hexadécavalents par assemblage itératif..... | 80 |
| II.3.3. | Synthèse de glycoconjugués polyfonctionnels | 82 |
| II.3.4. | Assemblage de glycoclusters par ligation CuAAC..... | 84 |
| II.3.5. | Caractérisation des glycoclusters | 88 |
| III. | Etude des propriétés biologiques des glycoclusters | 112 |
| III.1. | Evaluation biologique des glycoclusters vis-à-vis de différentes lectines | 113 |
| III.1.1. | Tests biologiques réalisés..... | 113 |
| a. | Test ELLA..... | 113 |
| b. | Test d'héماغglutination..... | 114 |
| III.1.2. | Interaction des dérivés mannosylés avec la lectine ConA | 115 |
| a. | Structure de la lectine Con A | 115 |
| b. | Exemples d'inhibiteurs de la lectine Con A..... | 115 |
| c. | Résultats des études biologiques | 117 |
| III.1.3. | Interaction des dérivés fucosylés avec la lectine UEA-I..... | 118 |
| a. | Structure de la lectine UEA-I..... | 118 |
| b. | Exemples d'inhibiteurs de la lectine UEA-1 | 118 |
| c. | Résultats des tests biologiques | 119 |
| III.1.4. | Interactions des glycoconjugués avec les galectines..... | 121 |
| a. | Présentation des galectines 3 et 4..... | 121 |
| b. | Résultats des tests biologiques | 122 |
| III.1.5. | Interaction des glycoclusters avec la lectine bactérienne PA-III | 123 |
| a. | La bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 123 |

| | |
|--|-----|
| b. Présentation de la lectine PA-III | 124 |
| c. Exemples d'inhibiteurs de la lectine PA-III..... | 125 |
| d. Résultats des tests biologiques | 126 |
| III.2 Propriétés immunologiques..... | 132 |
| III.2.1. Les cellules NK | 132 |
| III.2.2. Exemples de candidats immunomodulateurs | 134 |
| III.2.3. Résultats des tests biologiques | 134 |
| a. Rappel des structures testées | 134 |
| b. Résultats des études biologiques | 135 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 141 |
| PARTIE EXPERIMENTALE | 145 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 185 |

Publications

1. **I. Bossu**, M. Šulc, K. Křenek, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, P. Dumy, V. Křen, O. Renaudet. Dendri-RAFTs: A Second Generation of Cyclopeptide-Based Glycoclusters. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1948-1959.
2. S. André, O. Renaudet, **I. Bossu**, P. Dumy, H.-J. Gabius. Cyclic glycodecapeptides: how to increase their inhibitory activity and selectivity on lectin/toxin binding to a glycoprotein and cells. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 427-437.
3. O. Renaudet, K. Křenek, **I. Bossu**, P. Dumy, A. Kádek, D. Adámek, O. Vaněk, D. Kavan, R. Gažák, M. Šulc, K. Bezouška, V. Křen. Synthesis of Multivalent Glycoconjugates Containing the Immunoactive LELTE Peptide: Effect of Glycosylation on Cellular Activation and Natural Killing by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6800-6808.
4. **I. Bossu**, N. Berthet, O. Renaudet, P. Dumy. Synthesis of glycopeptides by click chemistry and Inhibition Assay. *J. Carbohydrate. Chem.* **2011**, .
5. **I. Bossu**, B. Richichi, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of α - and β -L-fucopyranosylhydroxylamines. Book Chapter in Carbohydrate Chemistry: Proven Methods, Editor P. Kovac, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.
6. O. Renaudet, **I. Bossu**, P. Dumy. Synthesis of multi-epitopic glycopeptide-based cancer vaccines. Book Chapter in Biologically Responsive Hybrid Biomaterials, Editors E. Jabbari, A. Khademhosseini, Artech House Publishing, Boston, MA, 2010.
7. **I. Bossu**, B. Thomas, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of a multivalent glycocyclopeptide using oxime ligation. Book Chapter in Carbohydrate Chemistry: Proven Methods, Editor P. Kovac, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011, in press.

Oral Communications () and Posters*

- (*) I. Bossu, N. Berthet, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet. Stratégies modulables d'assemblages de glycoclusters biologiquement actifs. Glucidoc 2011, Sète, 3-6 mai 2011.
- (*) I. Bossu, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet. Dendri-RAFTS : synthèse et étude d'une seconde génération de glycoclusters. 17ème Réunion du Groupe Français des Peptides et des Protéines, Aussois, 30 janvier-04 février 2011.
- (*) I. Bossu, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet. Synthèse et étude de glycoclusters comme inhibiteurs de la lectine PA-IIL. Journée de l'école Doctorale Chimie et Sciences du Vivant - Université J. Fourier, Grenoble, 21 juin 2010. Prix de la meilleure communication orale.
- I. Bossu, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet. Synthèse et étude de glycoclusters comme inhibiteurs de la lectine PA-IIL. Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, Grenoble, 3 juin 2010.

L. BenMohamed, V. Kren, I. Bossu, P. Dumy, O. Renaudet. Glycoconjugués multivalents pour l'immunothérapie antitumorale. Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, Grenoble, 3 juin 2010.

(*) I. Bossu, E. Dufour, N. Berthet, J. Garcia, A. Imberty, P. Dumy, O. Renaudet. Synthesis of multivalent neoglycopeptides and biological study with PA-III lectin, COST Workshop-CM0701, Semmering (Autriche), 18-21 janvier 2010.

(*) I. Bossu, E. Dufour, J. Garcia, O. Renaudet, P. Dumy. Synthèse et étude de glycoclusters comme inhibiteurs de la lectine PA-III. 16ème Réunion du Groupe Français des Peptides et des Protéines, Aussois, 10-15 mai 2009.

(*) I. Bossu, Radek Gazak, Vladimir Kren, P. Dumy, O. Renaudet. Chemoselective assembly of cyclopeptide-based glycoclusters as immunomodulators. COST Workshop-D34-00732, Utrecht (Pays-Bas), 10-11 décembre 2008.

Abréviations et acronymes

| | | | |
|------------------------|--|--------------------------|--|
| Å | Angstrœm | ou HOSuc | N-Hydroxysuccinimide |
| Ac | Acétyle | NK | Natural Killer |
| AcOEt | Acétate d'éthyle | nm | Nanomètre |
| AcOH | Acide acétique | NOE | Nuclear overhauser effect |
| Ac₂O | Anhydride acétique | NOESY | Nuclear overhauser effect spectroscopy |
| ADN | Acide desoxyribonucléique | PAMAM | Polyamidoamine |
| Aloc | Allyloxy-carbonyle | PEG | Polyéthylène glycol |
| BSA | Bovine serum albumin | PEGA | Résine poly(éthylène glycol)-diméthylacrylamide |
| Boc | Tertiobutyloxy-carbonyle | HOPht | N-hydroxyphthalimide |
| Bn | Benzyle | PNA | Peanut Agglutinin ou Peptide Nucleic Acid |
| BnBr | Bromure de benzyle | PPE | poly(<i>p</i> -phenylène ethynylène) |
| C_{ar.} | Carbones aromatiques | ppm | Partie par million |
| CCM | Chromatographie sur couche mince | PTC | Catalyse par transfert de phase |
| CBP | Carbohydre Binding Protein | PyBOP[®] | (benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate |
| CD | Cyclodextrine | RAFT | Regioselectively addressable functionalized template |
| ConA | Concanavaleine A | ROMP | Ring Opening Metathesis Polymerisation |
| CuAAC | Copper Catalysed Azide-Alkyne Cycloadditions | ROP | Ring Opening Polymerisation |
| DAST | Trifluorure de diétylamino-sulfure | RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| DCC | N,N-dicyclohexylcarbodiimide | SM (ESI) | Spectrométrie de masse (ionisation par électrospray) |
| DCL | Chime combinatoire dynamique | SPPS | Synthèse peptidique sur phase solide |
| DCM | Dichlorométhane | SPR | Surface plasmon résonance |
| Dde | 1(4,4diméthyl2,6 dioxocyclohexylidene)éthyle | T ou TF | Résidu Gal-β1-3-GalNAc |
| DIPEA | N,N-Diisopropyléthylamine | t.a | Température ambiante |
| DMF | N,N-Diméthylformamide | TASP | Template assembled synthetic protein |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde | TCA | Trichloroacétimide |
| Ea | Energie d'activation | tBu | tertiobutyle |
| EDA | Ethylène diamine | TEA | Triéthylamine |
| ELLA | Enzyme-like lectin assays | TFA | Acide trifluoroacétique |
| éq. | Equivalent molaire | THF | Tétrahydrofurane |
| Et₂O | Ether éthylique | TIS | Triisopropylsilane |
| EtOH | Ethanol | Tn | Résidu GalNAc |
| Fmoc | 9-Fluorénylméthoxycarbonyle | TNBS | Acide trinitrobenzène sulfonique |
| GCOSY | Gradient correlation spectrometry | TOCSY | Total correlated spectroscopy |
| GSL | Glycosphingolipides | TOF | Time-of-flight mass spectrometry |
| H_{ar.} | Protons aromatiques | t_r | Temps de rétention |
| HIA | hemagglutination inhibition agglutination | UEA | Ulex Europeus |
| HIV | Human immunodeficiency virus | UH | Unité d'hémagglutination |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazole | UV | Ultraviolet |
| HPLC | Chromatographie Liquide Haute Performance | V | Vitesse de réaction |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique | VAA | Viscum Album L. agglutinin |
| K_a | Constante d'association | λ | Longueur d'onde |
| K_d | Constante de dissociation | | |
| (m, μ)g | (milli, micro) gramme | | |
| (m, μ)L | (milli, micro) litre | | |
| (m, μ)mol | (milli, micro) mole | | |
| (m, μ)M | (milli, micro) molaire | | |
| MALDI | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation | | |
| MeOH | Méthanol | | |
| NHS | | | |

Introduction

I. Introduction

I.1. Les glycoconjugués

Les sucres représentent la classe de biomolécules naturelles la plus abondante. On peut donc les trouver sous forme soluble ou encore associés à des lipides ou protéines membranaires. On parle respectivement de glycolipides ou de glycoprotéines. Les glycoconjugués membranaires sont constamment modifiés notamment par des réactions enzymatiques (glycosylation, phosphorylation, ...) qui se produisent au niveau des groupements hydroxyles des sucres. Ces modifications ont pour effet de contribuer au repliement et/ou à la protection des glycoconjugués envers les dégradations enzymatiques. De plus, ils possèdent une organisation structurale particulière qui dépend étroitement du tissu ou de la cellule sur lesquels ils sont exprimés. Les glycoconjugués constituent ainsi la signature moléculaire d'un tissu ou d'une cellule.

✓ *Les glycoprotéines*

Il existe plusieurs types de glycoprotéines qui se distinguent par le type de liaison glycosidique entre le résidu sucre et l'acide aminé avec lequel il est associé:

- Les *N*-glycoprotéines¹ : contiennent généralement un résidu β -GlcNAc lié par la fonction amine d'un résidu asparagine de la protéine. On les trouve exprimés à la surface des cellules des mammifères.
- Les *O*-glycoprotéines² : contiennent un oligosaccharide (GalNAc, GlcNAc, Gal, Fuc, Xyl...) lié le plus souvent en configuration α à un groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Ce type de structure se retrouve plus particulièrement exprimé sur les cellules des muqueuses et présentent organisation typique en forme de grappe.

✓ *Les glycolipides*

Les lipides membranaires glycosylés se différencient en plusieurs classes (Figure 1). Les lipopolysaccharides sont la plupart du temps impliqués dans de nombreuses infections bactériennes. On les trouve le plus souvent chez les bactéries Gram négative. L'un des exemples le plus connu est le lipide A. Une autre classe est représentée par les

¹ R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631-664.

² G. J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, 27, 57-92.

Glycosphingolipides³ (GSL). Très présents chez les animaux, ils constituent l'une des trois principales familles de lipides membranaires avec les phospholipides et le cholestérol.

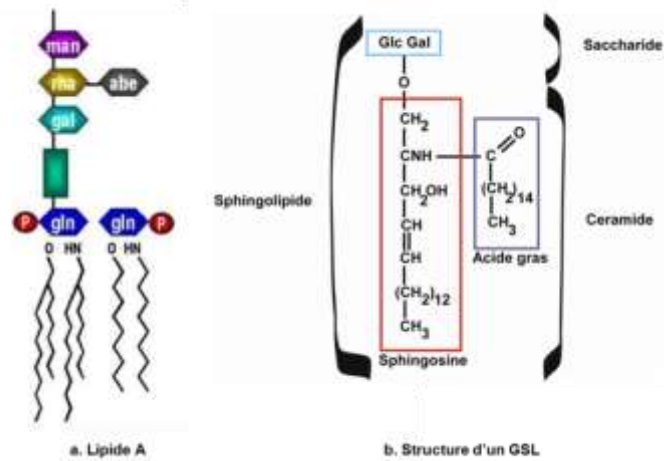


Figure 1. Exemples de structures de Glycolipides

En plus de leur rôle structural chez les plantes ou les bactéries, il a été montré que les glycoconjugués sont impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques⁴ reposant sur des interactions sucres/protéines. Ces interactions régissent en effet la plupart des processus biologiques tels que la migration, la différenciation et la communication cellulaire ou les phénomènes d'adhésion hôte-pathogène (Figure 2).⁵ Le développement de molécules capables de mimer ces structures offre donc de nombreuses perspectives en biologie et représente un thème de recherche particulièrement étudié à l'heure actuelle.

³ T. L. Doering, W. J. Masterton, G. W. Hart, P. T. Englund, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 611-614.

⁴ A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.

⁵ T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3, 701-710.

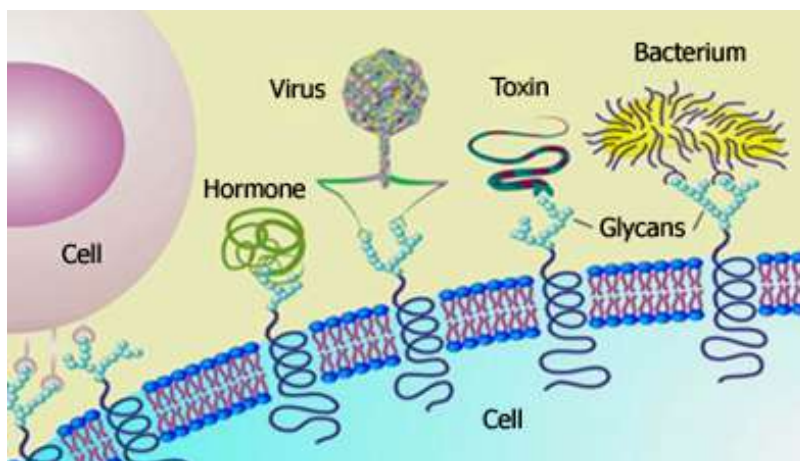


Figure 2. Phénomènes d'interaction sucre-protéine

I.2. Les interactions sucre/protéines

I.2.1. Définition

Les protéines, comme des enzymes ou des anticorps, capables d'interagir de manière non covalente et réversible avec les oligosaccharides sont largement répandues dans la nature. Les lectines possèdent également cette caractéristique⁶. Elles sont présentes dans de nombreux organismes tels que les virus, les bactéries, ou encore dans les plantes ou animaux. Classées en diverses catégories selon leur substrat, elles sont capables de lier de manière réversible des sucres simples ou sous forme d'oligosaccharides avec une haute spécificité. Liées à des cellules, elles induisent une agglutination cellulaire par un phénomène de cross-linking, ce qui permet leur détection ou leur caractérisation.

Les interactions sucre-protéine se produisent en général *via* des liaisons hydrogènes, des contacts hydrophobes ou par l'intermédiaire de cations. Leur affinité généralement faible de l'ordre du mM n'est pas significative d'un manque de sélectivité. La Nature compense cette faiblesse par des interactions multivalentes qui augmentent fortement l'affinité des protéines pour leur ligand.

I.2.2. Les interactions monovalentes

Pour comprendre l'importance et le rôle fonctionnel des interactions multivalentes, il est nécessaire d'avoir une vision globale des caractéristiques des interactions monovalentes

⁶ H. J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, D. Solis, *Trends Biochem. Adv.* **2011**, 36, 298-313.

impliquées dans la reconnaissance. Comme l'ont montré les études cristallographiques, les sites d'interaction sont en général à la surface cellulaire et exposés au solvant. Les interactions sucre-protéine sont influencées par divers paramètres⁷.

1.2.3. Liaisons hydrogènes

Avec les nombreuses fonctions hydroxyles présentées au sein des sucres, les liaisons hydrogènes⁸ jouent un rôle important dans la reconnaissance protéine-ligand. Bien que les contributions énergétiques de ces liaisons non covalentes soient encore discutées, l'orientation des liaisons hydrogènes est primordiale pour la spécificité de la protéine pour le ligand. Différents acides aminés présents dans le site d'interaction peuvent se lier avec certains groupements hydroxyles quel que soit leur configuration spatiale. Dans le cas des lectines, les acides aminés sont de type acide glutamique, acide aspartique ou asparagine. Par exemple, il existe de nombreuses structures cristallographiques montrant des liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales du groupe carboxylate d'un même acide aspartique et les fonctions alcools du galactose en positions 3 et 4 (Figure 3).

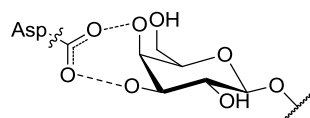


Figure 3. Liaison hydrogène entre un acide aspartique et les hydroxyles 3 et 4 d'un galactose

De par sa capacité⁹ à agir comme accepteur et donneur de liaisons hydrogènes, l'eau joue un rôle important dans les interactions sucre-protéine. Elle joue à la fois un rôle de « relai » en formant un réseau de liaisons hydrogène entre le ligand et la protéine, et participe également au maintien de la conformation du site d'interaction.

1.2.4. Contacts hydrophobes

En dépit de leurs nombreux groupements hydrophiles, les sucres possèdent également une surface non polaire pouvant interagir de manière complémentaire avec des acides aminés hydrophobes (Figure 4). La formation des liaisons hydrogènes oriente le ligand de manière à aligner les surfaces de même nature du ligand et du site d'interaction. Les résidus aromatiques dans ou en périphérie du site de reconnaissance de la protéine entrent ainsi en interaction avec les sucres liés.

⁷ L. L. Kiessling, T. Young, T. D. Grubber, K. H. Mortell, *Glycoscience* **2008**, 2483-2523.

⁸ B. A. Williams, M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 22907.

⁹ R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 373-380.

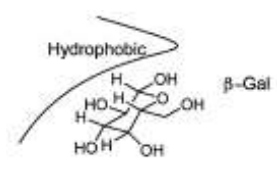


Figure 4. Face non polaire du galactose

1.2.5. Le rôle des cations

La présence de cations¹⁰, le plus souvent des ions calcium ou manganèse, est généralement indispensable pour l'interaction de nombreuses familles de lectines avec un ligand (Figure 5).

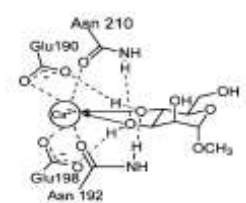


Figure 5. Exemple du Mannose en interaction avec un ion calcium dans un site de complexation

La fonction la plus courante de ces ions est purement structurale en servant de ligand de coordination pour orienter les groupements hydroxyles du ligand. Ils maintiennent également l'architecture du site d'interaction de la protéine.

I.3. Les interactions multivalentes

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les processus biologiques impliquant des sucres et des protéines utilisent généralement des interactions multivalentes (ou « effet cluster ») afin d'améliorer l'affinité et la spécificité de ces phénomènes. Cependant, deux phénomènes liés à la formation de liaisons non covalentes doivent être différenciés : la coopérativité et la multivalence. La coopérativité¹¹ se définit par l'influence de l'interaction d'un ligand avec le récepteur sur l'interaction de ligands supplémentaires présents, conduisant à un effet agoniste ou antagoniste. Nous ne discuterons pas de cet effet plus en détail ici. En revanche, pour obtenir un effet cluster, si x unités sucres sont présentes au sein de la même molécule, le potentiel d'interaction du ligand doit être au moins x fois supérieur à celui observé pour le ligand monovalent référence. Si le potentiel relatif est identique, aucun effet cluster n'est observé et le gain apparent n'est donc dû qu'à un effet statistique.

¹⁰ H. Feinberg, D. A. Mitchell, K. Drickamer, W. I. Weis, *Science* **2001**, 294, 2163.

¹¹ C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7488-7499.

Dans les interactions multivalentes, plusieurs mécanismes peuvent être observés simultanément ou non¹². Le premier mécanisme est lié à un « *effet chélate* » (Figure 6a). Cet effet résulte de l'interaction simultanée d'épitopes saccharidiques multiple d'un ligand multivalent avec des récepteurs oligomériques (Figure 6b). La diminution du pouvoir de libre rotation et de translation du système permet d'obtenir un fort gain d'interaction. En effet, le coût entropique est payé uniquement lors de la première interaction, rendant ensuite les suivantes plus favorables. Le second mode d'interaction est « *l'effet cluster* ». Dans ce cas, la liaison d'un premier ligand induit un rapprochement des récepteurs (clustering) le long de la paroi cellulaire, favorisant ainsi l'interaction de ligands supplémentaires. Un autre mode d'interaction possible est un effet concentration locale en ligand c'est-à-dire un « *effet statistique* » (Figure 6c). En effet, une densité importante de ligands au sein du même site peut augmenter l'affinité de manière significative selon un mécanisme d'association/dissociation se déroulant en deux temps. Un complexe temporaire récepteur-ligand se forme puis après sa dissociation, un autre complexe impliquant un ligand voisin peut se former grâce à une concentration locale importante en ligand. Cet effet est cependant moins important sur l'affinité qu'un effet chélatant. Un dernier mode d'interaction possible est un « effet de cross-linking » (non représenté sur ce schéma) induisant un réseau par pontage entre plusieurs récepteurs de différentes protéines.

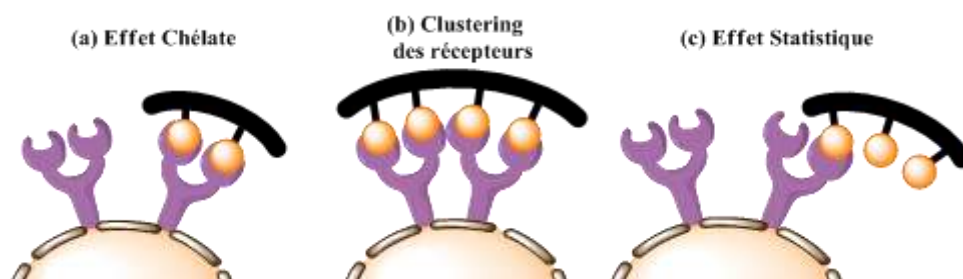


Figure 6. Principaux mécanismes impliqués dans la reconnaissance multivalente

Il faut noter que ces différents modes d'interactions peuvent dans certains cas se produire simultanément, ce qui complique d'autant plus la compréhension des mécanismes de reconnaissance entre un ligand et son récepteur.

¹² a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-327; b) M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794.

Pour faciliter leur étude et développer des outils moléculaires utilisables pour des applications diagnostiques et thérapeutiques, un grand nombre de structures glycosylées multivalentes ont été conçues et synthétisées au cours des vingt dernières années. La partie suivante décrit les principales familles de composés décrites dans la littérature. C'est dans ce contexte que c'est inscrit mon travail de thèse.

I.4. Structure de glycoconjugués multivalents

Une structure glycosylée multivalente, ou glycocluster, est tout d'abord constituée d'une plateforme servant à présenter plusieurs copies de motifs de reconnaissance osidique, généralement de même nature, dans une topologie variable. Bien que la conception de ces structures, nommées homoglycoclusters, soit difficile à rationaliser, plusieurs critères tels que le nombre d'unité saccharidique présenté (valence), le bras espaceur et le support sont à considérer.¹³ Ces paramètres sont en effet essentiels pour développer des glycoconjugués biologiquement actifs, au même titre que la structure tridimensionnelle de la cible :

- le *support* : est un système moléculaire contenant de multiples sites chimiquement réactifs qui servent d'ancrage pour les ligands. De nombreuses classes de supports multivalents sont utilisées pour la conception de ces composés qui diffèrent par leur topologie ou leurs propriétés conformationnelles. La structure influence fortement la manière de présenter le sucre à sa cible biologique.

- la *valence* : elle représente le nombre d'unités sucre connectées au sein de la même molécule. Il est généralement admis que la présence de multiples copies est nécessaire pour permettre des interactions multivalentes avec une cible biologique. Cependant, il existe dans la plupart des cas un nombre « limite » au-delà duquel aucune amélioration d'affinité n'est observée.

-le bras espaceur : la synthèse de molécules multivalentes repose sur l'introduction de ligands *via* un *bras espaceur multifonctionnel* qui permet de multiplier le nombre de sites d'ancrage fourni par la nature du support et donc d'augmenter le nombre de sucres au sein de la molécule. Il fournit en plus d'une connectivité covalente, un espacement, une orientation et des propriétés conformationnelles (flexibilité ou rigidité) devant permettre aux unités

¹³ a) D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 966-979. b) A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 3409-3424.

saccharidiques d'accéder plus facilement au site d'interaction de la cible. Idéalement, il doit être stable chimiquement et en milieu biologique.

Plus récemment, des nouvelles familles de structures présentant plusieurs motifs osidiques différents ont été développées. Ces composés, nommés hétéroglycoclusters, présentent un intérêt croissant pour reproduire l'expression hétérogène des oligosaccharides présents sur la surface cellulaire. Il est en effet fréquent d'observer que des variations de distribution de motif saccharidique n'affectent pas l'affinité de la protéine pour son ligand mais seulement sa sélectivité. Ceci s'explique par la présence de sites d'interaction « secondaires » à proximité du site de liaison principal qui peuvent être liés simultanément par des sucres de différente nature. Le développement de ce type de systèmes présentant différents motifs et une densité contrôlée est donc nécessaire pour comprendre ces interactions secondaires et les exploiter pour développer des ligands plus sélectifs.

1.4.1. Les dendrimères

Les dendrimères sont des structures branchées obtenues par élongation successive d'unités polyfonctionnelles autour d'un élément central exposant en bout de chaîne un nombre variable de sucres. Ces molécules possèdent une structure globulaire présentant des surfaces hyper-glycosylées à valence contrôlée où chaque branchement constitue une nouvelle « génération ». Cette famille de composés est très étudiée avec de nombreux exemples d'application. Ils peuvent être préparés selon différentes stratégies de synthèse : divergente, convergente (Figure 7).

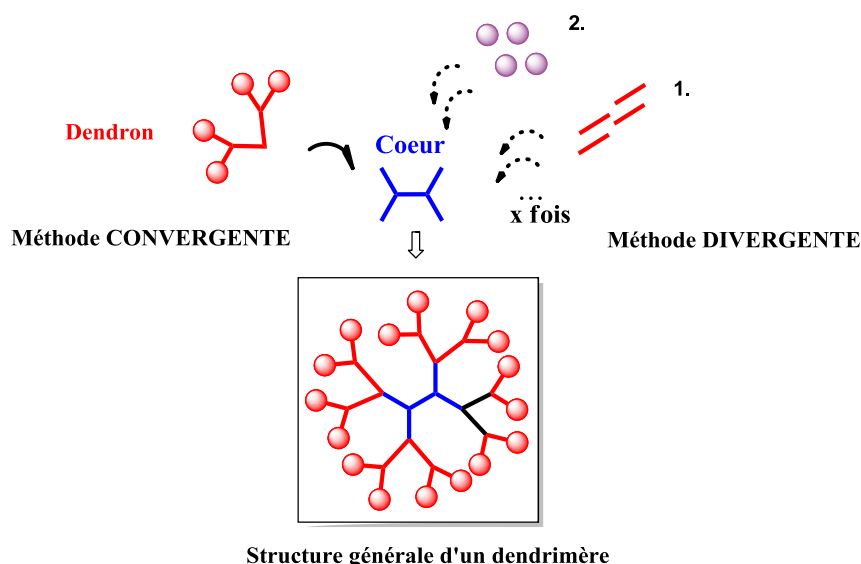


Figure 7. Méthodes de synthèse d'un dendrimère

La *stratégie divergente* qui consiste en l'extension du dendrimère par couches successives à partir d'un cœur multifonctionnel est une méthode assez longue et fastidieuse. En effet, les différents bras espaceurs sont introduits étape par étape ce qui peut conduire à la formation de sous-produits partiellement fonctionnalisés difficilement séparables. Pour éviter ces problèmes, les travaux de Fréchet et Hawker¹⁴ décrivent une *méthode convergente* qui permet de préparer au préalable des dendrons qui sont ensuite introduits en une étape unique sur un cœur polyfonctionnel. Ceci permet de limiter le nombre d'étapes de synthèse et les sous-produits éventuellement formés sont plus faciles à purifier dans ce cas. La nature des ramifications et du cœur utilisée par cette méthode peuvent être très variables. Le cœur est le plus souvent constitué d'acides aminés modifiés, tels que la lysine, l'ornithine¹⁵, la proline¹⁶, l'acide diamino propionique¹⁷, ou à base de β -alanine disubstituée¹⁸, ou contenir un cœur commercial tels que les polyamidoamines (PAMAMS) ou des noyaux benzéniques.

Différents exemples de glycodendrimères à base d'acides aminés naturels ou modifiés ont été rapportés dans la littérature. L'équipe de Roy et *al* a développé des exemples de dendrimères qui présentent une structure spatiale différente à base de poly-L-lysines exhibant 2, 4, 8 et 16 acides sialiques à leur surface (Figure 8). Ces molécules ont montré une activité en tant qu'inhibiteur du Virus Influenza.

¹⁴ I. Gitsov, K. L. Wooley, C. J. Hawker, P. T. Ivanova, J. M. J. Fréchet, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5621-5627.

¹⁵ H. Baigude, K. Katsuraya, K. Okuyama, K. Hatanaka, E. Ikeda, N. Shibata, T. Uryu, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 1400-1414.

¹⁶ G. Sanclimens, L. Crespo, E. Giralt, M. Royo, F. Albericio, *Biopolymers* **2004**, *76*, 283-297.

¹⁷ D. Lagnoux, T. Darbre, M. L. Schmitz, J. L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3941-3950.

¹⁸ J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.

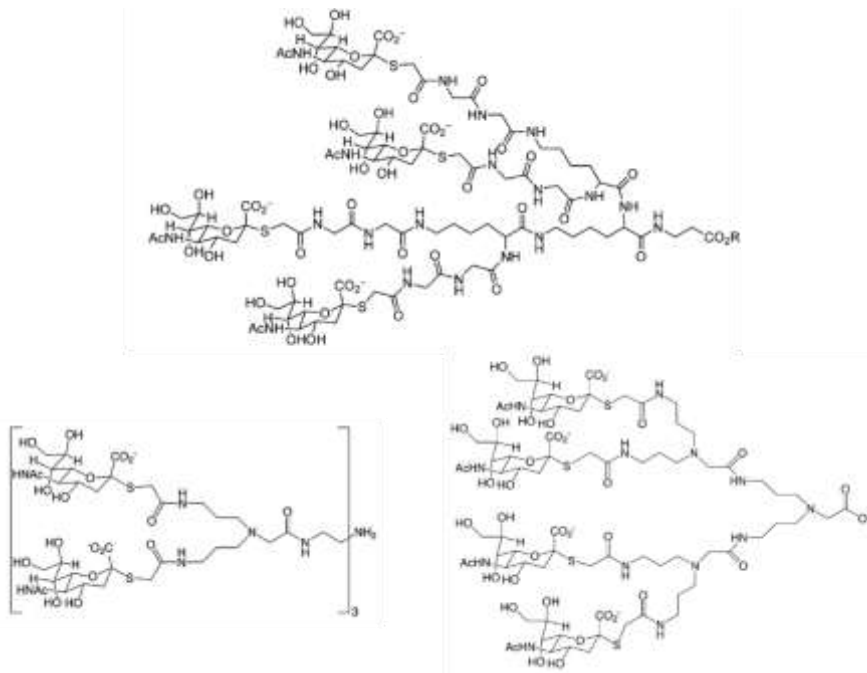


Figure 8. Exemple de structures dendrimériques

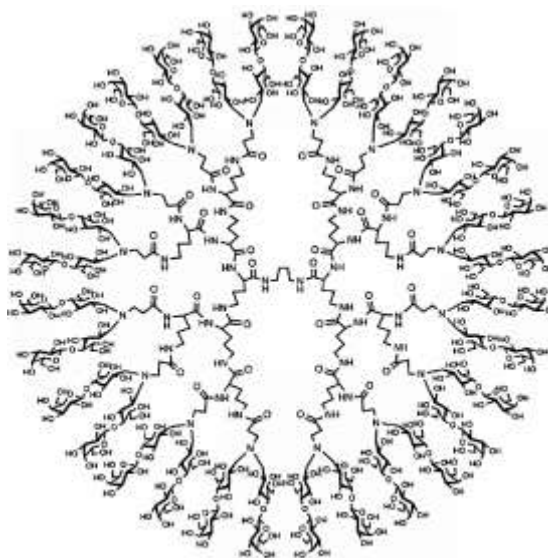


Figure 9. Exemple de dendrimère à base d'ornithine

Dans l'exemple de synthèse de dendrimères à base d'ornithine, les structures sont hémisphériques ou sphériques suivant la génération du dendrimère. Ainsi, il a été possible de substituer jusqu'à 32 résidus sucres (maltose ou lactose sous forme réduite) au sein de la molécule (Figure 9). Ces constructions sont étudiées en tant que candidat comme vaccin pour le virus HIV.

Un autre exemple de glycodendrimères à base de *N,N'*-bis(acrylamido)acide acétique décoré par l'antigène TF, marqueur osidique de certaines tumeurs, a été publié par l'équipe de R. Roy. Cette famille présente une valence de 2 à 6 sucres. Ces structures sont étudiées en tant que ligand d'une lectine végétale¹⁹. L'introduction d'une biotine a également permis d'étudier ce type de structures comme vaccin antitumoral²⁰.

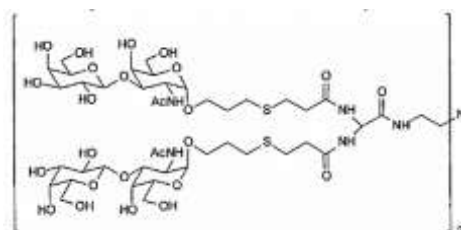


Figure 10. Exemple de dendrimère à base de *N,N'*-bis(acrylamido)acide acétique

Les glycoPAMAM possèdent un cœur 3-amino acide propanoïque. Cette classe de dendrimères est particulièrement étudiée. L'équipe de Cloninger a ainsi rapporté une librairie de glycoclusters globulaires de une à six générations fonctionnalisés par de l' α -D-mannose²¹ ou du glucose à partir de bras espaceurs thioéther de six carbones (Figure 11). Ces molécules ont ainsi pu montrer des propriétés d'interactions avec des lectines végétales²².

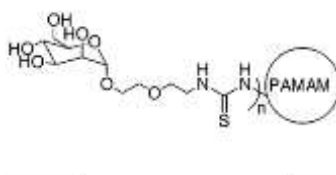


Figure 11. Structure générale des dendrimères mannosylés G1 à G6

L'équipe de R. Roy a également pu créer une série de composés comportant de 4 à 32 unités saccharidiques²³. Les cœurs PAMAM commerciaux sont décorés par des disaccharides α -TF. Le bras espaceur dans cette structure dendrimérique est un bras thioamine de six atomes (Figure 12). D'autres composés ont été synthétisés avec différents bras espaceurs pour étudier l'influence de la longueur du linker sur la reconnaissance.

¹⁹ R. Roy, M. G. Baek, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 291-309.

²⁰ R. Roy, M. G. Baek, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1809-1816.

²¹ E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, 4, 7-10.

²² a) K. H. Schlick, R. A. Udelhoven, G. C. Strohmeyer, M. J. Cloninger, *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 295-301. b) E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan; D. J. Singel, M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8820-8826.

²³ a) M.G. Baek, R. Roy, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 11-17. b) R. Roy, M. G. Baek, *Methods Enzymol.* **2003**, 362, 240-249.

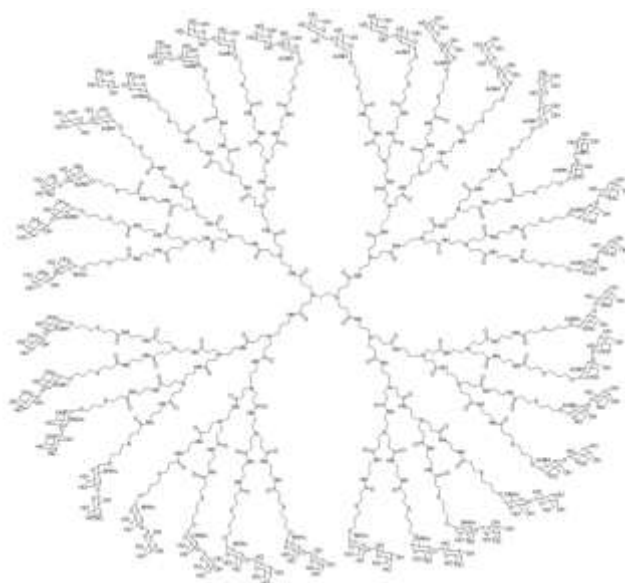


Figure 12. Exemple de structure dendrimérique à 32 unités saccharidiques

La méthode de chimie combinatoire dite de « *split and mix* » est une approche intéressante pour accéder à des bibliothèques de peptides dendrimériques de compositions variables (figure 13). L'équipe de Jean-Louis Reymond a synthétisé une bibliothèque de 390 625 glycodendrimères puis l'a criblée avec des cibles biologiques telles que les lectines PA-III (dont nous évoquerons l'importance un peu plus loin dans ce manuscrit) ou UEA-I²⁴. Ils ont ainsi pu identifier un glycocluster tétravalent de haute affinité.

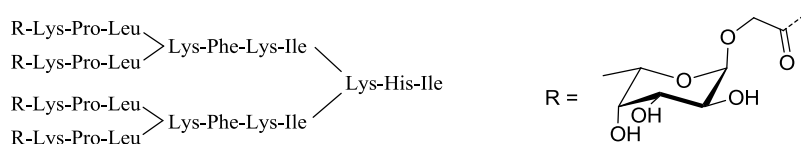


Figure 13. Exemple de dendrimère peptidique obtenu par chimie combinatoire

La chimie combinatoire dynamique (DCL) a également été utilisée avec succès dans ce domaine par l'équipe de Jean-Marie Lehn. Le principe de cette méthode consiste à former une bibliothèque contenant des mélanges de composés en solution à partir de building blocks pouvant se lier covalamment de manière réversible. La composition du mélange peut ainsi évoluer selon différents facteurs, notamment en présence d'une cible biologique qui entraîne un déplacement d'équilibre en faveur de la formation du composé le plus stable

²⁴ E. M. V. Johansson, E. Kolomiets, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J. L. Reymond, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1291-1299.

thermodynamiquement. Ce processus dynamique de sélection permet ainsi d'enrichir un mélange combinatoire avec la molécule possédant la plus forte affinité pour la cible. Une librairie de 474 individus a été obtenue par les auteurs grâce à des liens acylhydrazones résultant d'une condensation entre un aldéhyde et une hydrazine (Figure 14). Les cœurs ont été sélectionnés de manière à porter de un à trois points d'attaches pour générer des systèmes multivalents. Les épitopes saccharidiques ont été fonctionnalisés par un groupement benzaldéhyde en position anomérique et la librairie a été formée à pH modérément acide (pH 4). En présence d'une lectine végétale, le mélange peut évoluer jusqu'à la formation du meilleur ligand résultant de la combinaison moléculaire la plus adéquate.

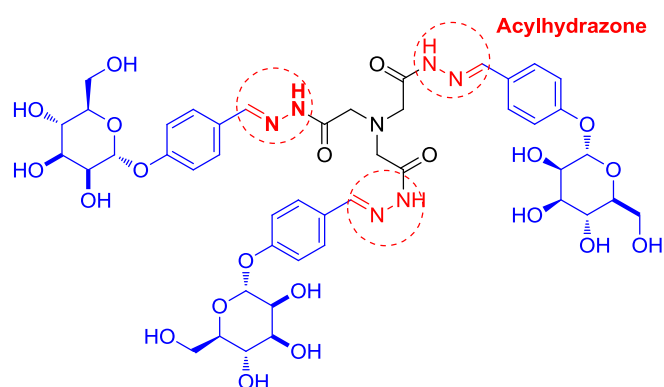


Figure 14. Structure du tripode mannosylé le plus efficace²⁵

Comme nous l'avons vu, les structures dendrimériques ont montré leur efficacité dans de nombreuses applications biologiques. Une autre topologie de châssis intéressante et plus rigide se présente sous forme de structures polymériques cycliques comme les cyclodextrines et les calixarènes qui permettent de mieux contrôler l'organisation spatiale des épitopes saccharidiques.

1.4.2. Les châssis polymériques cycliques : cyclodextrines et calixarènes

✓ Les calixarènes

Les calixarènes sont des structures multivalentes qui sont fortement employées dans divers domaines de bio-nanotechnologie comme la délivrance de molécules cibles, l'encapsulation moléculaire ou encore l'inhibition d'agents pathogènes (Figure 25)²⁶. Nous allons ici plus

²⁵ O. Ramström, S. Lohmann, T. Bunyapaiboonsri, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1711-1715.

²⁶ a) A. Dondoni, *Chem. Asian. J.* **2007**, *2*, 700-708. b) L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266.

particulièrement nous intéresser à l'inhibition d'agents pathogènes ou encore leur propriétés antiadhésives. Les calixarènes sont des plateformes cycliques relativement rigides offrant des possibilités de moduler la distribution et la flexibilité conformationnelle des sucres. Ce sont des composés macrocycliques obtenus à partir de réaction basique induite entre un phénol et le formaldéhyde. Ils sont la plupart du temps constitués de quatre, six ou huit unités benzéniques. Les calix-[4]-arènes peuvent adopter 4 conformations distinctes à température ambiante : cône, cône partiel, 1,2-alterné et 1,3-alterné (Figure 15). Ces conformations peuvent être bloquées par l'introduction de groupements alkyls et permettre ainsi une distribution d'épitopes *via* diverses topologies.

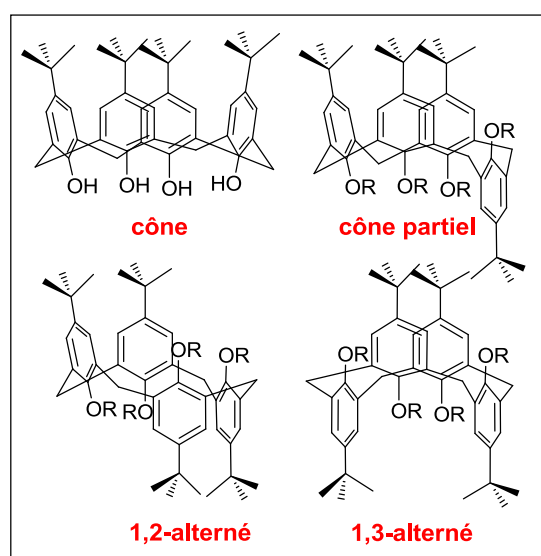


Figure 15. Différentes conformations du calix-[4]-arène

Les premiers exemples de calixarènes fonctionnalisés par des sucres remontent à une vingtaine d'années. Un exemple plus récent développé par l'équipe d'A. Marra et A. Dondoni est constitué d'un calix-[4]-arène en conformation cône stabilisée par alkylation des groupements phénoliques par des chaînes propyles²⁷. Les sucres sont introduits *via* des bras espaceurs tétrazoles dans le domaine supérieur de la cavité (Figure 16).

²⁷ A. Dondoni, A. Marra, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6339-6345.

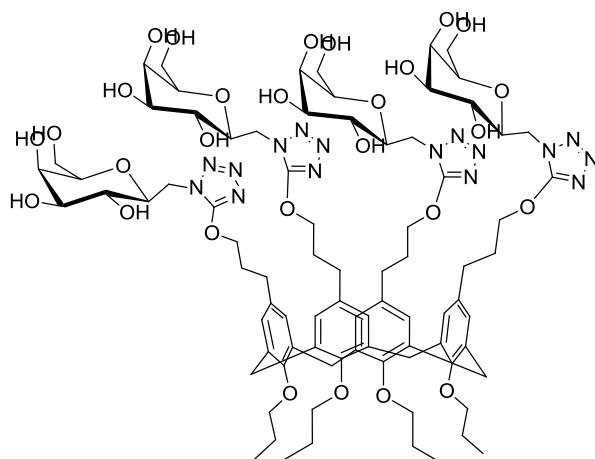


Figure 16. Exemple d'un glycolix-[4]-arène tétravalent en conformation cône

Dans un autre exemple, l'équipe d'Ungaro *et al*²⁸ a conçu une famille de 14 calix-[n]-arènes qui présentent une série de galactose et lactose contenant de 2 à 8 entités dans diverses conformations. Les épitopes saccharidiques sont introduits par lien thiourée sur le bord supérieur du châssis cyclique. Selon les conformations du calix-[n]-arène, les sucres sont répartis dans un seul domaine spatial (domaine supérieur par rapport au support) ou dans les domaines inférieur et supérieur simultanément en conformation alternée (Figure 17). Ces ligands multivalents ont été testés comme inhibiteurs de galectines, lectines spécifiques du résidu galactose. Les études ont montré des différences d'inhibition selon les conformations des calix-[n]-arènes. Ces résultats seront plus amplement détaillés dans le second chapitre de ce manuscrit.

²⁸ S. André, F. Sansone, H. Kaltner, A. Casnati, J. Kopitz, H. J. Gabius, R. Ungaro, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1649-1661.

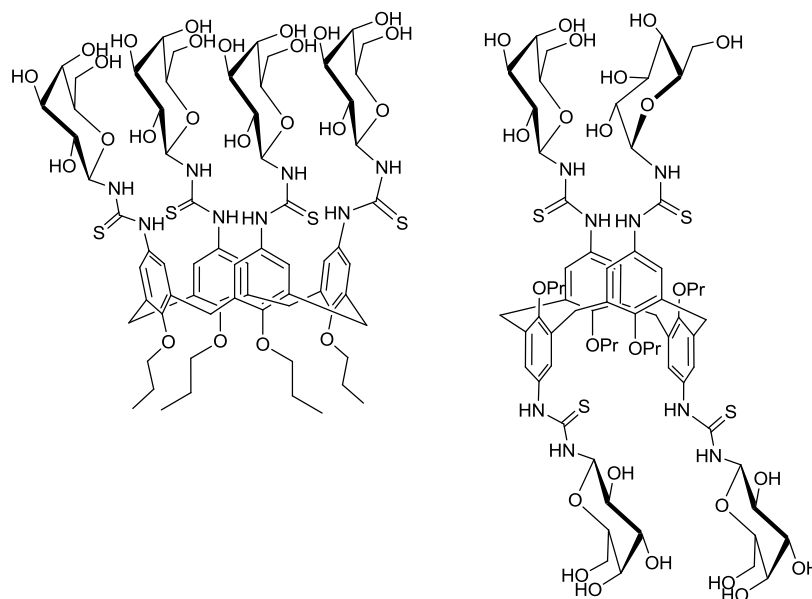


Figure 17. Exemples de structures à base de calix-[4]-arènes en conformation cône et 1,3-alternée

D'autres exemples de molécules possédant une cavité phénolique de taille variable ont été développés. Par exemple, les travaux réalisés par l'équipe de S. Vidal²⁹ ont porté sur la synthèse de calix-[6]-arènes modifiés pour l'introduction d'épitopes saccharidiques *via* des espaceurs éthylènes glycols. En effet, ces châssis à six unités phénoliques permettent d'introduire les sucres dans un espace assez étroit même si leur rigidité est plus faible que pour les calix-[4]-arènes. Deux composés multivalents contenant trois et six sucres de même nature (le galactose) ont été obtenus (Figure 18).

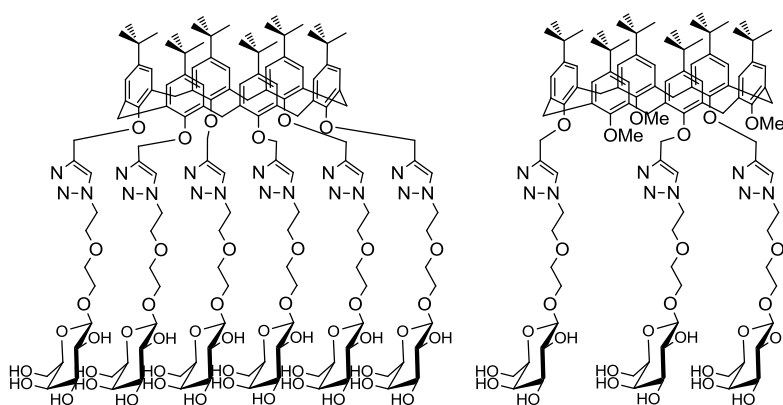


Figure 18. Exemples de calix-[6]-arènes à trois et six épitopes

²⁹ S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrat-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2146-2159.

Ces structures multivalentes ont été testées en tant que ligand de lectines notamment pour l'inhibition de la lectine PA-IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

Les calix-[n]-arènes présentent donc des propriétés intéressantes dans leur géométrie spatiale ainsi que dans leur régiosélectivité sur les deux faces. Elles peuvent ainsi être fonctionnalisées de manière orthogonale et conduire à l'obtention de glyoclusters complexes. Ces composés entièrement synthétiques sont facilement modifiables et permettent de contrôler le nombre de ligands introduits ainsi que leur position. Le principal inconvénient réside toutefois dans la nature du cœur aromatique peu adapté à des applications biologiques *in vivo*.

✓ Les cyclodextrines

Parmi les structures cycliques, les cyclodextrines ont également été particulièrement étudiées ces dernières années.

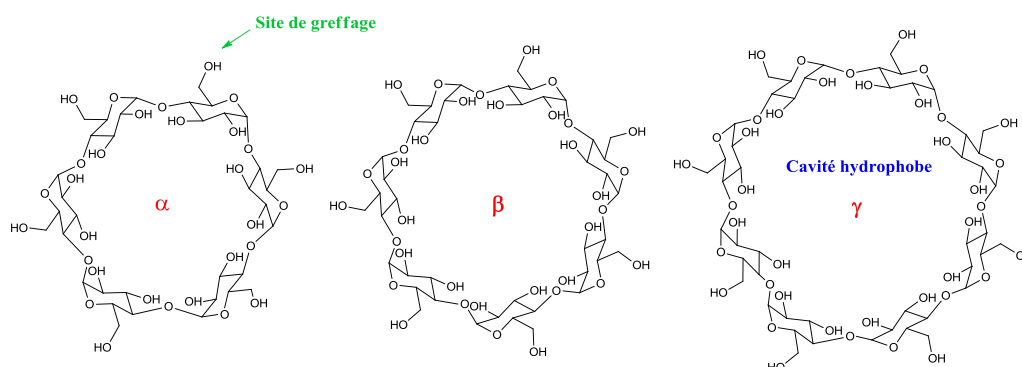


Figure 19. Schéma général des différentes cyclodextrines α , β et γ

Ce sont des oligosaccharides cycliques³⁰ qui peuvent être composés par six, sept ou huit résidus α -1,4-D-glucopyranoside respectivement appelés α , β , et γ -CDs (Figure 19). L'avantage de ce type de structure est la conformation spatiale définie qui va permettre de limiter la flexibilité du cœur. La cyclodextrine contient deux classes de groupements hydroxyles : les hydroxyles 6-OH primaires situés sur la circonférence de la face primaire et les hydroxyles 2- et 3-OH situés sur la face secondaire. Leur différence de réactivité permet de réaliser des modifications régiosélectives. Les structures saccharidiques à la surface peuvent être fonctionnalisées, soit directement, soit par introduction de bras espaceurs. Ces structures présentent également l'avantage de posséder une cavité hydrophobe de taille

³⁰ a) C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1982-1990. b) D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 655-672.

comprise entre 0.45 nm et 0.85 nm qui leur confère des propriétés d'encapsulation de nombreux substrats en milieu aqueux³¹. Elles sont de plus de faible toxicité.

Les cyclodextrines peuvent être directement fonctionnalisées par un nombre variable de sucres pour l'obtention de structures à valence variable en utilisant des bras espaceurs multifonctionnels comme dans l'exemple développé par l'équipe de J. Defaye et J. M. Garcia-Fernandez (Figure 20).

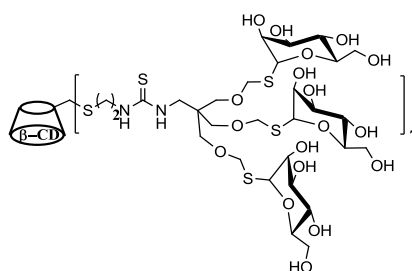


Figure 20. Exemple d'une cyclodextrine exhibant 21 épitopes saccharidiques

Les auteurs ont ainsi développé une série d'homo- et hétéro-cyclodextrines comportant 7, 14 et 21 unités sucres (Figure 20)³². Les sucres sont introduits par des bras tripodes comportant trois sucres pouvant être de natures différentes. Ces molécules ont été testées en présence d'une lectine afin d'étudier l'influence d'un environnement hétérocluster notamment en présence d'un β-glucose et d'un lactose.

Les auteurs ont également développé plus récemment des exemples de cyclodextrines mannosylées polycationique. Ces composés comportent de manière alternée sur la face primaire d'une β-cyclodextrine des unités mannoses et des unités cationiques sur un bras espaceur thiouré. La face secondaire de la cyclodextrine est fonctionnalisée par des chaînes aliphatiques (Figure 21).

³¹ K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2045-2076.

³² M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7970-7971

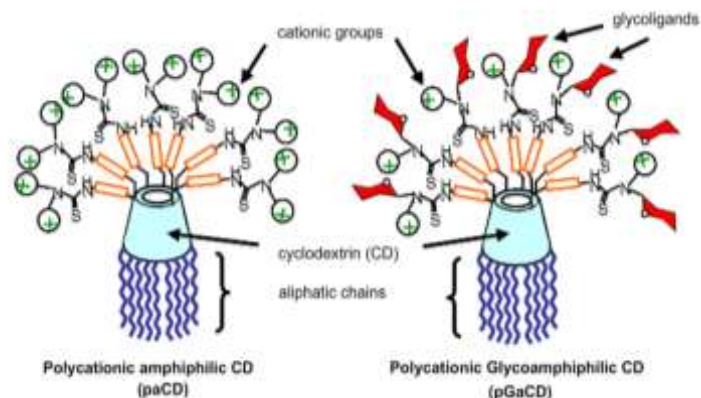


Figure 21. Exemple de cyclodextrine polycationique

Un autre exemple original de glycocluster à base de β -cyclodextrine a été développé par l'équipe de J. F. Stoddart. Cette équipe a fonctionnalisé des β -cyclodextrines avec une géométrie particulière afin d'exploiter leurs propriétés d'encapsulation³³. Un glycocluster fonctionnalisé par des bras espaceurs porteur un total de 2, 3 ou 6 sucres et encapsulant un ferrocène a permis de réaliser des études électrochimiques (Figure 22).

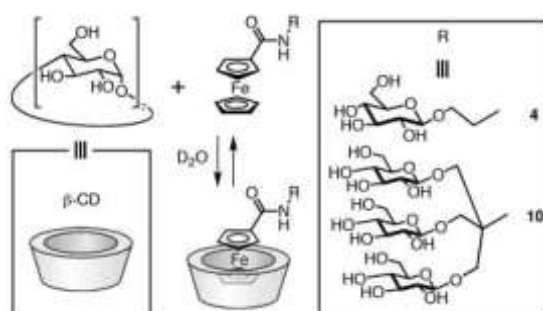


Figure 22. Exemple d'une cyclodextrine encapsulée dans un ferrocène

Les propriétés d'inclusion de la cyclodextrine ont été également exploitées pour développer des pseudopolyrotaxanes à partir d'une α -cyclodextrine par l'équipe de S. Fort *et coll.*³⁴(Figure 23). Ces oligorotaxanes sont construits par la méthode de Huisgen en assemblant des complexes d'inclusion entre une α -cyclodextrine glycosylée et une chaîne aliphatique de 10 atomes.

³³ P. R. Ashton, V. Balzani, M. Clemente-Leon, B. Colonna, A. Credi, N. Jayaraman, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, M. Venturi, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 673-684.

³⁴ M. Chwalek, R. Auzély, S. Fort, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1680-1688.

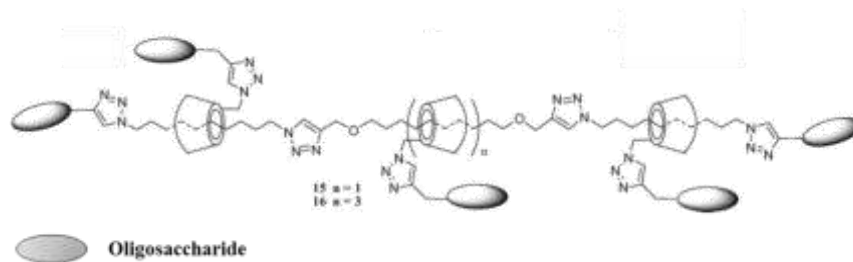


Figure 23. Exemple de pseudopolyrotaxane de S. Fort et coll.

Un autre exemple de pseudopolyrotaxanes a été réalisé par l'équipe de Stoddart³⁵ (Figure 24). La cyclodextrine monovalente est fonctionnalisée par un sucre. Elle est ensuite introduite par auto-assemblage le long du polymère qui comporte 17 sites d'ancrage pour la cyclodextrine. Les propriétés biologiques³⁶ de ce type de structure seront discutées dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

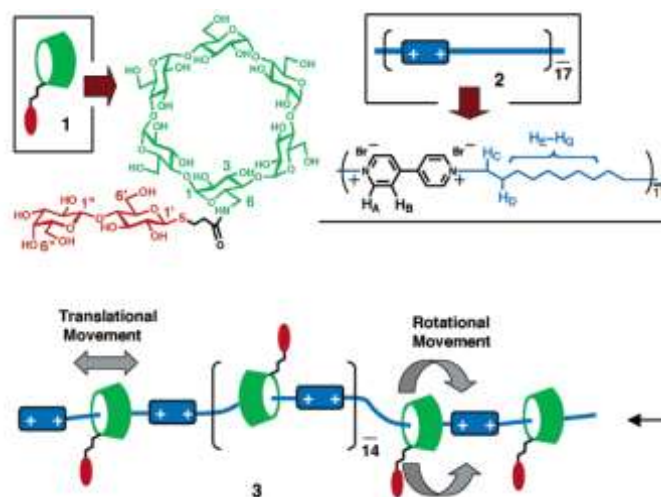


Figure 24. Pseudopolyrotaxane comme ligand de galectine

Malgré les nombreuses propriétés de ce support, les difficultés de fonctionnalisation régiosélective des sites de greffage peut poser problème pour l'utilisation de ce type de châssis, bien qu'il soit non-toxique et peu cher. Il existe cependant des méthodes de déprotection sélective de groupements benzènes qui permet l'introduction de fonction amine, alcool ou acide carboxylique³⁷ comme de points d'ancrage orthogonaux pour des motifs osidiques.

³⁵ A. Nelson, J. M. Belitsky, S. Vidal, C. Steven Joiner, L. G. Baum, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11914-11922.

³⁶ J. M. Belitsky, J. F. Stoddart, ACS Symposium Series, 960, Chap. 19, 356-374, **2001**.

³⁷ a) M. Sollogoud, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1295-1303. b) S. Guieu, M. Sollogoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7060-7063

1.4.3. Les sucres comme plateforme de présentation

Des composés commerciaux de plus petite taille peuvent également servir de supports multivalents. Par exemple, les cinq fonctions hydroxyles d'un monosaccharide, le D-glucose, ont été utilisées comme site d'ancrage de branches glycosylées, qui sont ainsi orientées selon la configuration spatiale axiale ou équatoriale (Figure 25). Ceci permet de créer des molécules multivalentes à partir d'un cœur de petite taille, facilement modifiable régioselectivement même si l'introduction de branches glycosylées de taille importante peut causer des problèmes d'encombrement stérique.

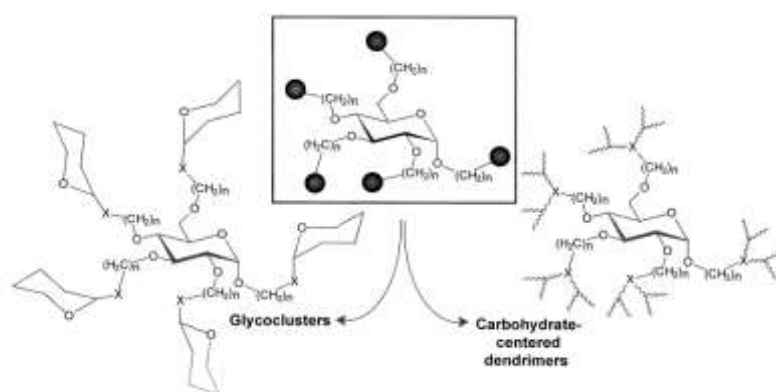


Figure 25. Développement de glycoclusters dendrimériques à cœur glycosidique³⁸

L'équipe de D. Bundle ont ainsi pu développer une molécule décavalente à partir du D-glucose³⁹. Le cœur glycosidique est décoré à partir d'une méthode mise en place par l'équipe de T. K. Lindhorst³⁸ par cinq bras espaceurs aliphatiques d'une longueur de 30 Å portant les deux trisaccharidiques Pk. Cette molécule appelée STARFISH présente une puissante activité inhibitrice envers la toxine Sigha-like I et représente un exemple le plus remarquable d'amélioration apportée par une molécule multivalente décrit à ce jour (Figure 26).

³⁸ M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Carbohydrate Res.* **1998**, *310*, 35-41.

³⁹ P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.

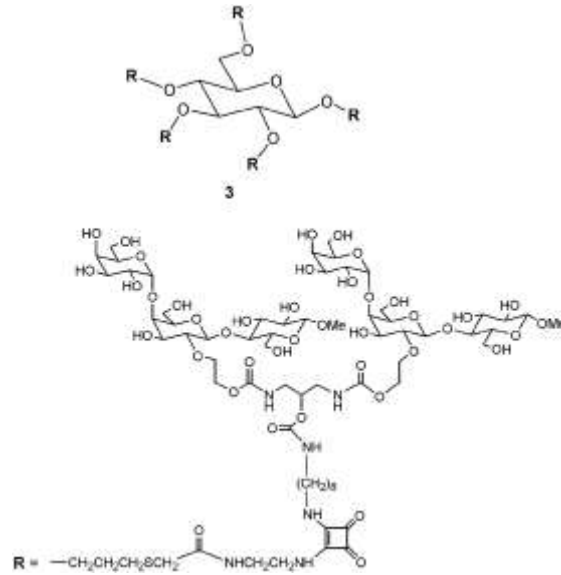


Figure 26. Structure du STARFISH

Cette équipe a mené des études biologiques *in vivo* de ce composé montrant une efficacité partielle contre la toxine ciblée. Une amélioration de la molécule STARFISH nommée DAISY a cependant permis une protection complète contre les deux formes de la toxine. La molécule DAISY comporte un bras espaceur aliphatique plus long lié directement sur le carbone anomère du sucre réducteur, ce qui favorise l'interaction simultanée de plusieurs motifs osidiques avec les cinq sous-unités de la protéine comme l'illustre la Figure 27⁴⁰.

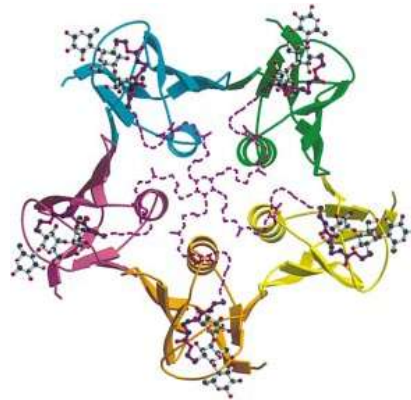


Figure 27. Structure cristallographique du dimère formé par la toxine SHIGA avec le STARFISH

⁴⁰ G. L. Mulvey, P. Mercato, P. I. Kitov, J. Sadowska, D. R. Bundle, G. D. Armstrong, *J. Infect. Dis.* **2003**, 187, 640-649.

L'équipe de T. K. Lindhorst a rapporté en 2001 la synthèse d'un dendrimère à cœur glycosidique⁴¹ (Figure 28). A partir de deux unités glucoses, des bras espaceurs thiourées relativement courts sont introduits sur les hydroxyles. La molécule présente ainsi une valence de 8 unités mannoses. Cette molécule trouve des applications comme inhibiteurs de l'adhésion de bactéries *Escherichia coli* aux molécules hôtes.

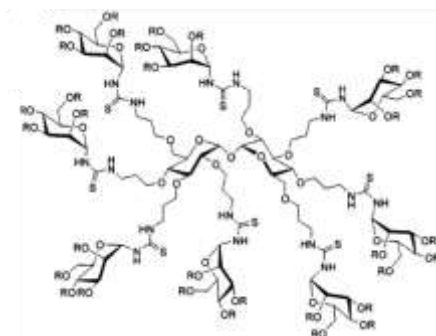


Figure 28. Structure du dendrimère à partir d'un cœur disaccharide

1.4.4. Les polymères

Les glycopolymères représentent une famille de composés largement étudiée depuis plusieurs années. Les polymères permettent de présenter des sucres de façon multivalente et linéaire. Ces structures sont facilement obtenues par des méthodes d'élongation aisées à mettre en œuvre mais difficiles à contrôler. Il en résulte des composés de taille variable, estimée à partir de données RMN ¹H le plus souvent, qui permet d'accéder plus ou moins précisément au degré de polymérisation. La spectrométrie de masse MALDI-TOF qui semble la technique de caractérisation la plus adaptée présente des limitations liées à la masse trop importante de ce type de composés et à des problèmes d'ionisation. Cette méconnaissance de la masse réelle des composés ne permet d'envisager l'utilisation de ce type de structures en tant que médicaments. De plus, la purification de ces molécules de taille importante est relativement complexe à mettre en œuvre. Ces molécules peuvent être synthétisées par différentes méthodes de polymérisation : vinylique, radicalaire, cationique, anionique, ROMP, et ROP⁴².

Il a été développé récemment par l'équipe de P. Seeberger une méthode de greffage par lien amide de sucres mannosidiques sur un cœur polymérique rigide PPE (poly(*p*-phénylène ethynylène)) (Figure 29a)⁴³. Cette fonctionnalisation est réalisée par esters activés en milieu

⁴¹ M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Org. Lett.* **2001**, 3, 4019-4022.

⁴² a) M. Okada, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, 67-104. b) B. Voit, D. Appelhans, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211, 727-735.

⁴³ M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13343-13346.

basique après élongation du polymère, ce qui rend cette méthode versatile et utilisable pour introduire des marqueurs osidiques différents. Cependant, le taux de greffage de sucres sur le polymère n'est que de 25%. Une autre voie de synthèse permettant d'éviter ce problème nécessite au préalable de préparer un monomère qui est ensuite polymérisé en présence d'un catalyseur au palladium⁴⁴. Un polymère fluorescent complètement greffé par des saccharides a été obtenu par cette méthode puis utilisé en tant qu'agent de détection. Les auteurs ont ainsi pu démontrer son interaction avec des lectines présentes sur les pilis des bactéries *E. coli*, provoquant ainsi une agrégation des bactéries par « cross-linking ».

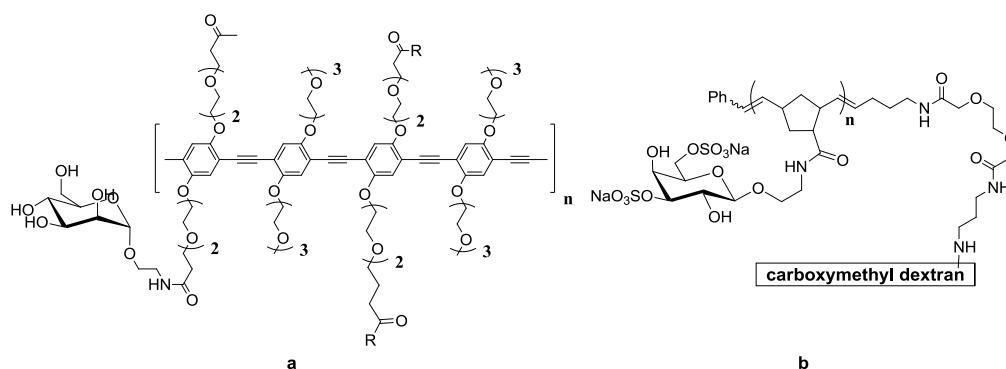


Figure 29. Structures Glyco-polymériques multivalentes

✓ ROMP

Les travaux de l'équipe de L. L. Kiessling ont permis de mettre au point une méthode de synthèse par polymérisation par ouverture de cycle afin d'obtenir des polymères solubles dans l'eau avec une faible polymolécularité (Figure 29b). Après élongation du polymère comportant des fonctions esters activés, des saccharides sulfatés sont introduits par lien amide. Dans ce cas, la taille de la molécule a été estimée par RMN à 85 unités. Cette molécule peut ensuite être immobilisée sur des surfaces afin d'étudier ces propriétés d'interactions par SPR avec des L- et P-sélectines⁴⁵. Cette étude a montré une affinité six fois supérieure au ligand monovalent vis-à-vis des sélectines. Ce type de polymère a trouvé d'autres applications pour étudier une lectine végétale (*Concanavaline A*) ou encore comme ligand spécifique du récepteur CD-22 qui sert à l'activation des lymphocytes B du système immunitaire⁴⁶.

⁴⁴ a) B. Erdogan, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2002**, *35*, 7862-7864. (b) J. J. Lavigne, D. L. Broughton, J. N. Wilson, B. Erdogan, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2003**, *36*, 7409-7412.

⁴⁵ J. E. Gestiwiki, C. W. Cairo, D. A. Mann, R. M. Owen, L. L. Kiessling, *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 149-155.

⁴⁶ a) M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932. b) Z. Q. Yang, E. B. Puffer, J. K. Pontrello, L. L. Kiessling, *Carbohydrate Res.* **2002**, *337*, 1605-1613.

✓ *Electropolymérisation*

Un sensorchip a été développé pour la détection de lectines par la méthode SPR (= Surface Plasmon Resonance). Généralement, la surface de la sensorchip est en or ou argent. Elle sert dans ce cas comme électrode pour la déposition d'un polymère conducteur. La génération de la surface est obtenue par électropolymérisation de dérivés osidiques fonctionnalisés par des pyrroles. L'étude SPR a pu mettre en évidence des propriétés d'interactions des polypyrroles décorés par des sucres (lactose ou lactose-sialylé) avec deux lectines végétales⁴⁷.

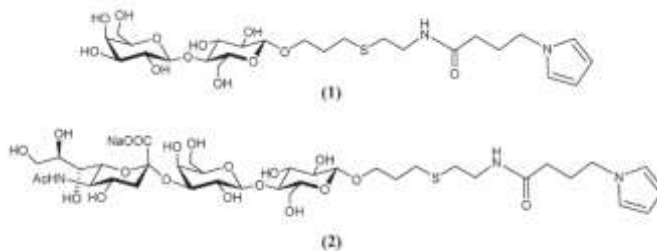


Figure 30. Structure des pyrroles glycosylées

Comme nous l'avons mentionné précédemment, un des inconvénients majeurs de ces structures est le manque de contrôle réel de la taille des molécules obtenues. De plus, le nombre de ligands saccharidiques introduits en post-élongation n'est pas connu précisément et leur poids moléculaire est donc incertain. L'évaluation de l'effet de multivalence reste donc imprécise. Enfin, la toxicité des chaînes polyaryl constitue également un obstacle important à leur utilisation en milieu biologique.

1.4.5. Oligomères linéaires à bases azotées ou peptidiques

✓ *Oligomère à bases azotées*

Les oligonucléotides présentent un intérêt important dans de nombreuses applications biologiques. La principale limitation de ces structures est leur sensibilité à la dégradation par les nucléases et leur faible pénétration cellulaire. Ces difficultés sont contournées par le développement de conjugués à base d'oligonucléotides comme des conjugués sucre-oligonucléotide qui ont été utilisés pour diverses applications. Ces oligomères sont obtenus le plus souvent à partir d'oligonucléotides par synthèse automatisée, ce qui facilite l'accès à des structures multivalentes. Ces structures ont déjà montré une capacité à interagir avec le

⁴⁷ C. Gondran, M. P. Dubois, S. Fort, S. Cosnier, S. Szunerits, *Analyst* **2008**, *133*, 206-212.

récepteur spécifique de l'endocytose et ainsi favoriser l'internalisation de la molécule au sein de la cellule⁴⁸. La stratégie de synthèse pour obtenir ces châssis repose sur la préparation de glycodendrons à partir de phosphoramidites modifiées soit par greffage de sucres post-élongation,⁴⁹ soit avec les résidus saccharidiques directement liés de manière covalente⁵⁰. Ces molécules ont l'avantage de plus d'être chargées négativement, ce qui permet de favoriser les interactions avec les cibles biologiques de charges opposées.

✓ L'équipe de F. Morvan²⁵ a ainsi développé des glycoclusters à base d'oligomères de phosphodiesterpentaerytritylés (PePOs). Les glycoconjugués comportent 4 à 10 résidus fucosylés introduits *via* un bras espaceur phosphorylé bi-alcyne (Figure 31). Ces composés ont été étudiés en tant qu'inhibiteur d'une lectine bactérienne.

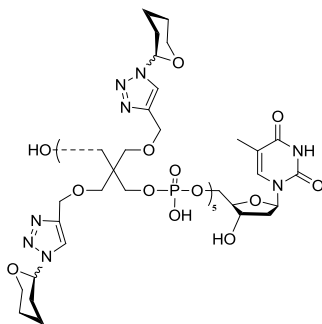


Figure 31. Glycocluster à base d'oligonucléotide à 10 épitopes

L'équipe de Lonnberg *et al.*⁵¹ a également développé un hétéroglycocluster hexavalent comportant deux natures de sucres différentes. Les unités glycosylées (mannose ou glucose) sont introduites *via* deux phosphoramidites modifiés au sein de la séquence (Figure 32). Ces structures sont réalisées afin de développer des méthodes alternatives à la chimiothérapie pour le traitement du cancer.

⁴⁸ M. Dubber, J. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 239-246.

⁴⁹ a) J. Katajisto, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7609-7615. b) J. Katajisto, P. Virta, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *15*, 890-896.

⁵⁰ F. Morvan, A. Meyer, A. Jochum, C. Sabin, Y. Chevolut, A. Imberty, J. P. Praly, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, S. Vidal, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1637-1643.

⁵¹ M. Karskela, M. Helkearo, P. Virta, H. Lonnberg, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 748-755.

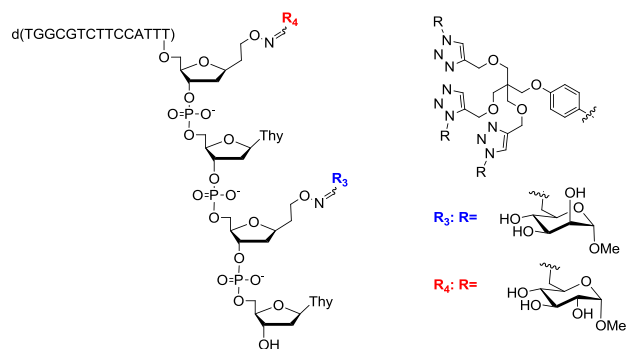


Figure 32. Exemple de conjugué sucre-oligonucléotide

✓ Les PNAs (= peptide nucleic acid)

L'ADN est un outil intéressant pour le développement de glycoclusters. Il existe cependant une limitation à leur utilisation du fait de leur sensibilité aux dégradations enzymatiques. Une alternative pour contourner cette difficulté est représentée par les PNAs. Ces oligomères à chaîne courte sont composés de bases reliées par des liaisons peptidiques ce qui les rend stables envers les enzymes (Figure 33a). De plus, ils possèdent une forte affinité pour l'ADN ou ARN puisqu'ils ne sont pas chargés électronégativement. Il n'existe donc pas de répulsion entre les brins. Il existe malgré ces avantages un problème de sélectivité. Les PNAs sont des supports fonctionnalisés pour le développement de nouveaux glycoclusters. Ainsi l'équipe de Winssinger⁵² a développé des conjugués PNAs-sucre. Ces composés permettent d'obtenir des hétéroglycoclusters divalents. Deux unités saccharidiques peuvent être introduites après élongation de la séquence en position *N*-terminale (Figure 33b).

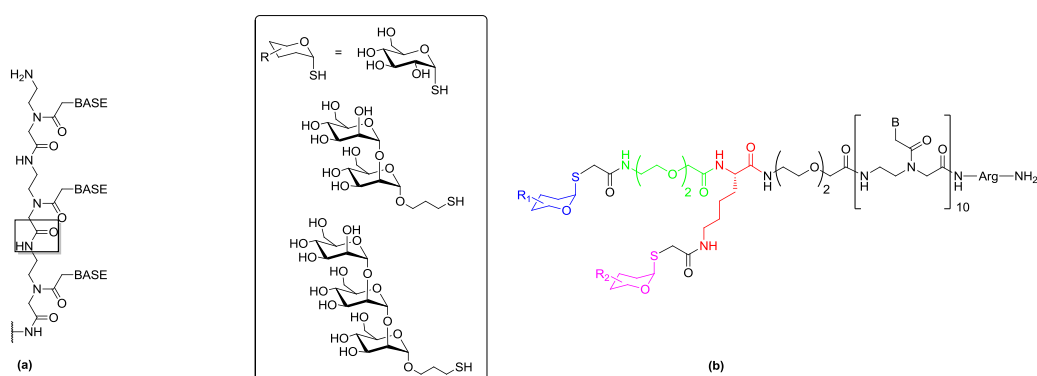


Figure 33. (a) Structure générale d'un PNA (b) Exemple d'un conjugué PNA-sucre divalent

⁵² K. Gorska, K. T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7695-7700.

D'autres conjugués PNA-sucres divalents ont été synthétisés pour constituer une bibliothèque de 30 composés par l'équipe de Kobayashi^{53,54}. Les unités sucres sont introduites dans en position *N*- et *C*-terminales. Cette librairie est ainsi obtenue par hybridation avec un brin d'ADN complémentaire (Figure 34). Elle est créée afin de mimer l'interaction de l'épitope saccharidique du HIV avec l'anticorps correspondant. Durant cette étude de la librairie, il a été montré qu'il existe une influence très importante du bras espaceur qui doit être de onze atomes.

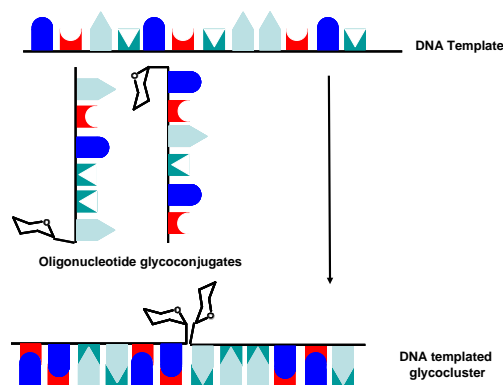


Figure 34. Exemple de structures à base de PNA

✓ Oligomères à base peptidique

Un grand nombre de peptides glycosylés conduisant à des analogues de glycoprotéines ou des structures natives complexes a également été synthétisé par des méthodes chimiques et chimioenzymatiques. Des *O*-glycopeptides obtenus par la méthode dite de « cassette » qui consiste à utiliser des acides aminés glycosylés et à les incorporer directement dans la séquence peptidique pendant l'assemblage sur phase solide ont été utilisés avec succès comme vaccins synthétiques anti-tumoraux⁵⁵ (Figure 35a). Une seconde méthode développée par le même groupe a conduit à la synthèse de *N*-glycopeptides en utilisant la réaction d'aspartylation de Lansbury⁵⁶ (Figure 35b).

⁵³ Y. Yamada, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1913-1922.

⁵⁴ K. Matsuura; M. Hibino, T. Ikeda; Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 352-359.

⁵⁵ S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X. -T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12474-12485.

⁵⁶ P. Wang, X. Li, J. Chen, Y. Yuan, X. Wu, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1567-1602.

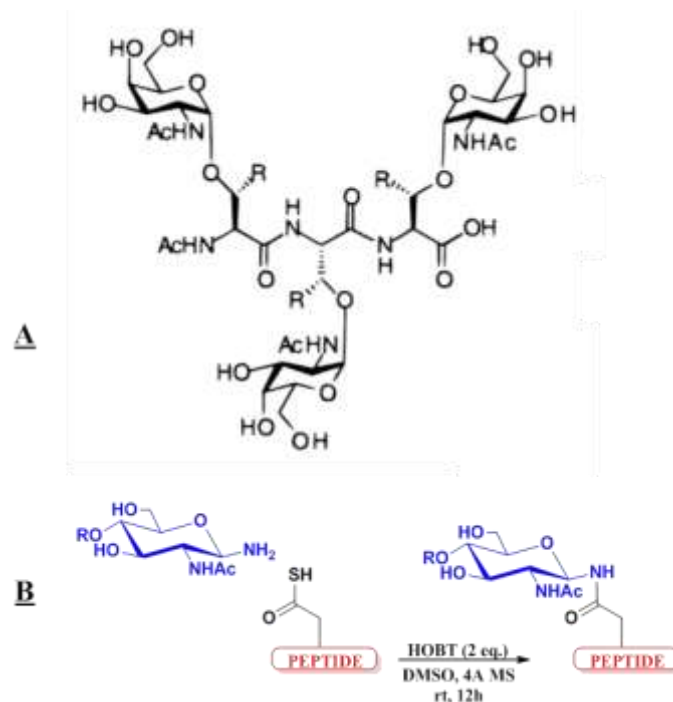


Figure 35. Exemple de glycopeptides multivalents synthétiques : a) cluster de l'antigène Tn utilisé pour la construction de vaccins antitumoraux b) N-glycopeptide

1.4.6. Glycoliposomes

Les phospholipides amphiphiles sont capables de s'auto-assembler pour former des structures fermées en bicouches en milieux aqueux, les liposomes. Ces structures peuvent facilement incorporer des molécules hydrophiles dans leur compartiment aqueux et des composés hydrophobes dans leur bicouche lipophile. Ils peuvent interagir directement avec les cellules par fusion des couches lipidiques. Les liposomes sont couramment utilisés comme nanovecteurs pour diverses applications biomédicales, comme marqueurs fluorescents pour le diagnostic ou le relargage contrôlé de molécules⁵⁷.

Ces structures ont été largement employées pour la construction de glycostructures multivalentes à partir de phospho- ou glyco-lipides pour mimer les glycoconjugués à la surface cellulaire. De nombreuses études biologiques menées sur des glycoliposomes ont démontré leur capacité à interagir avec différentes lectines. Ceci confirme l'accessibilité des saccharides à la surface des liposomes. Les interactions spécifiques de glycolipides avec des lectines végétales ont été particulièrement étudiées comme par exemple avec des

⁵⁷ a) V. P. Torchilin, *Nat. Drug. Disc.* **2005**, 4, 145-160. b) E. Soussan, S. Cassel, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 274-288.

glycoliposomes mannosylés incorporant des bras espaceurs de tailles variables⁵⁸. D'autres constructions similaires ont montré des propriétés particulièrement intéressantes pour la vectorisation ou l'immunothérapie⁵⁹ (Figure 36).

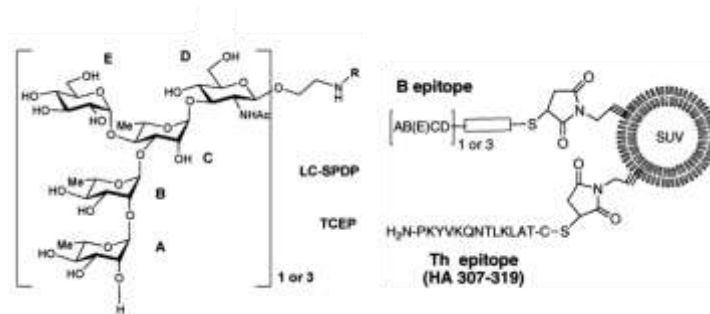


Figure 36. Exemple de glycoliposome pour l'immunothérapie

1.4.7. Les nanoparticules et nanotubes de carbone fonctionnalisées

Avec l'essor des nanosciences, des structures glycosylées à haute valence et de taille nanométriques ont été développées. Divers nano-objets variant par leur topologie et la nature de leur cœur ont été fonctionnalisés avec succès par des motifs carbohydrates.

✓ Les nanoparticules

Parmi les nanoparticules glycosylées les plus courantes, on trouve les nanoparticules d'or et d'argent, les semi-conducteurs quantiques et les nanoparticules magnétiques (Figure 37).

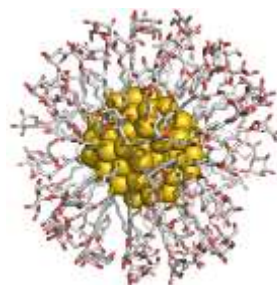


Figure 37. Exemple de nanoparticule mannosylée

Les nanoparticules d'or sont les nanoparticules métalliques les plus stables et présentent une large gamme de modèles d'assemblage, une relation taille-propriétés électroniques ainsi que des propriétés optiques et magnétiques particulièrement intéressantes. Ces structures

⁵⁸ A. Engel, S. K. Chatterjee, A. Al-Arifi, D. Riemman, J. Langner, P. Nuhn, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 51-57.

⁵⁹ F. S. Hassane, A. Phalipon, M. Tanguy, C. Guerreiro, F. Bélot, B. Frisch, L. A. Mulard, F. Schuber, *Vaccine* **2009**, *27*, 5419-5426.

présentent aujourd'hui de nombreuses applications en biologie et catalyse et ont fait l'objet de nombreuses publications. Divers protocoles de synthèse ont permis de développer des nanoparticules à taille contrôlée stables à l'air et à la température⁶⁰. Des sucres de différente nature ont pu être introduits sur ces nanoparticules comme le mannose, le lactose, le trisaccharide Lewis^x, le glucose ou encore le galactose. Il est également possible de réaliser des systèmes hybrides contenant différentes densités de sucres par une méthode décrite par le groupe de S. Penadès⁶¹. Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules contenant de 5 à 30% en lactose en utilisant un mélange de différents bras espaceurs et d'oligosaccharides modifiés avant la formation de la nanoparticule. Les bras espaceurs dans les exemples présentés dans la littérature sont composés de deux parties. La partie aliphatique d'une longueur généralement de onze atomes permet de protéger la nanoparticule en rigidifiant et stabilisant l'ensemble. La seconde partie constituée de PEGs (= polyéthylène glycol) aide à la solubilisation du système dans les tampons aqueux compatibles avec des études en milieu biologique. Il est ainsi possible d'obtenir des structures à deux (SAMs) et trois dimensions (glyconanoparticules) (Figure 38). Ces nanoparticules trouvent des applications dans les études d'interactions sucre-sucre ou sucre-protéine. Ces études sont menées grâce aux diverses méthodes de caractérisation des nanoparticules comme la RMN ¹H, la SPR, l'AFM et plus simplement lors des changements colorimétriques observés lors de la modification de la distribution des sucres en surface.

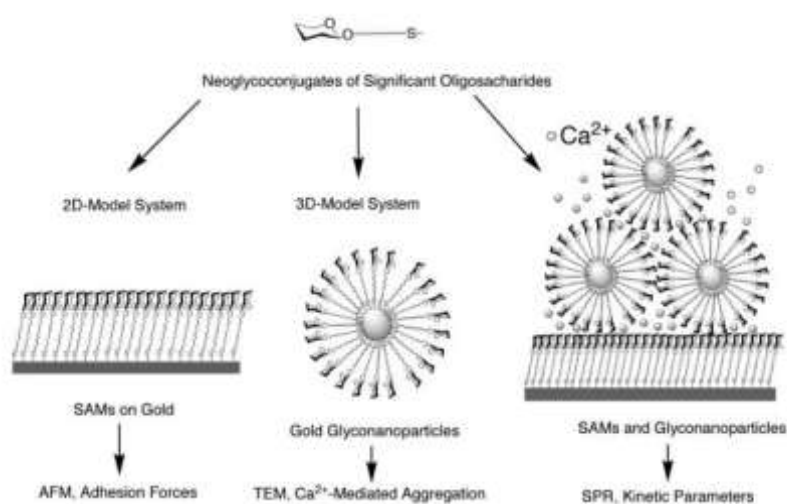


Figure 38. Structures 2D et 3D des nanoparticules d'Or

⁶⁰ J. M. de la Fuente, S. Penadès, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1760, 636-651.

⁶¹ A. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernandez, S. Penadès, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1909-1921.

Le second type de glyconanoparticule repose sur la fonctionnalisation de matériaux semiconducteurs (nanocristaux). Ce support possède des propriétés de luminescence exploitée pour l'étude de systèmes biologiques. En effet, il émet une fluorescence à une longueur précise suivant sa taille sur un temps relativement long. Différentes natures de biomolécules ont pu être couplées à ces nanocristaux tels que des protéines, peptides, des fragments ADN ou encore des anticorps. Cependant, peu d'exemples de glyconanocristaux ont été rapportés. Le premier exemple publié par Rosenzweig et *al.* en 2003 concernent des nanocristaux présentant à leur surface des mannoses pour l'étude d'une lectine végétale. Le groupe de Penadès ont également développé des nanocristaux de Cd et Zn protégés par des sucres maltose et Lewis^x.⁶²

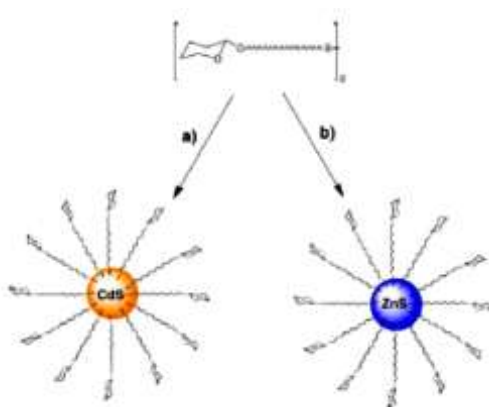


Figure 39. Structure des nanocristaux de Cadmium et Zinc

Les glyconanoparticules magnétiques présentent quant à elles des opportunités d'applications dans l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), le traitement des tumeurs malignes ou encore la délivrance ciblée de drogues. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont les plus communément employées pour les applications biologiques. Elles doivent posséder des caractéristiques particulières telles que des valeurs d'aimantation élevées, une taille inférieure à 20 nm dans une distribution de taille restreinte, une faible toxicité et de plus permettre l'assemblage de biomolécules⁶³. Une structure développée par le groupe de S. Penadès a

⁶² J. M. de la Fuente, S. Penadès, *Tetrahedron*, **2005**, *16*, 387-391.

⁶³ P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzales-Carreño, C. J. Serna, *J. Phys. (D, Appl. Phys.)* **2003**, *36*, R182-R197.

notamment montré la possibilité de réaliser des glyconanoparticules magnétiques à partir de nanoparticules d'or-fer fonctionnalisées par le lactose, le glucose et le maltose⁶⁴.

✓ *Les nanotubes de carbone*

Les nanotubes de carbone par leurs propriétés électrochimiques uniques présentent un intérêt croissant dans des applications biologiques comme agent d'imagerie et biocapteur. La fonctionnalisation de nanotubes de carbone avec des motifs osidiques permet de générer des systèmes solubles dans l'eau capable de mimer des surfaces cellulaires comme l'a montré le groupe de C. R. Bertozzi⁶⁵. Les mucines sont une famille de glycoprotéines présentant une glycosylation dense et caractéristique qui confère une rigidité au support polypeptidique⁶⁶. Les résidus α -GalNAc liés à la chaîne peptidique ont été identifiés pour être à l'origine de la rigidité. C'est pourquoi l'équipe de C. Bertozzi ont choisi de mimer ces structures en ne conservant que les épitopes GalNAc. Les saccharides sont introduits par lien oxime sur un châssis polymérique poly(MVK) (poly(vinylmethylcétone)) (Figure 40). Des analyses en diffusion de la lumière ont montré que les polymères fonctionnalisés par les épitopes saccharidiques ont une distribution rigide en solution. Les lipides étant connus pour leur propriété d'auto-assemblage sur les nanotubes de carbone, les auteurs ont choisi d'introduire sur les structures précédentes un lipide qui va ainsi permettre de décorer différents types de nanotubes de carbone. Un test de fluorescence avec une lectine marquée spécifique du GalNAc a permis de confirmer que propriétés de reconnaissance de ces nanotubes de carbones fonctionnalisés sont comparables à celles de mucines natives.

⁶⁴ S. Penadés, M. Martin-Lomas, J. M. de la Fuente, T. W. Rademacher, *Magnetic Nanoparticles*, WO 2004/108165 A2.

⁶⁵ X. Chen, G. S. Lee, A. Zettl, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6112-6116.

⁶⁶ T. Ju, V. I. Otto, R.D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2-24.

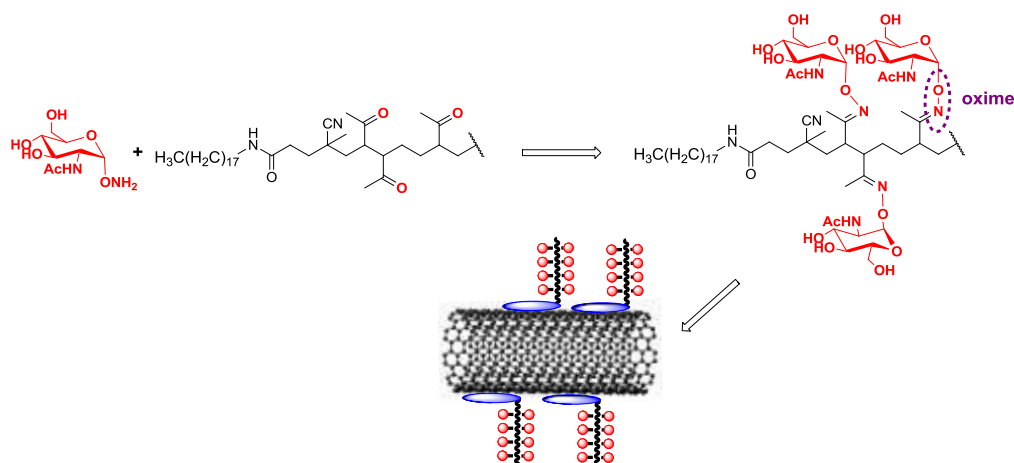


Figure 40. Mimes de mucine à partir d'un nanotube de carbone

1.4.8. Les cyclopeptides

Les premières études utilisant des peptides cycliques ont été menées par l'équipe du Pr. Mutter pour présenter des fragments peptidiques en une structure secondaire stable et ainsi obtenir des mimes de protéine⁶⁷.

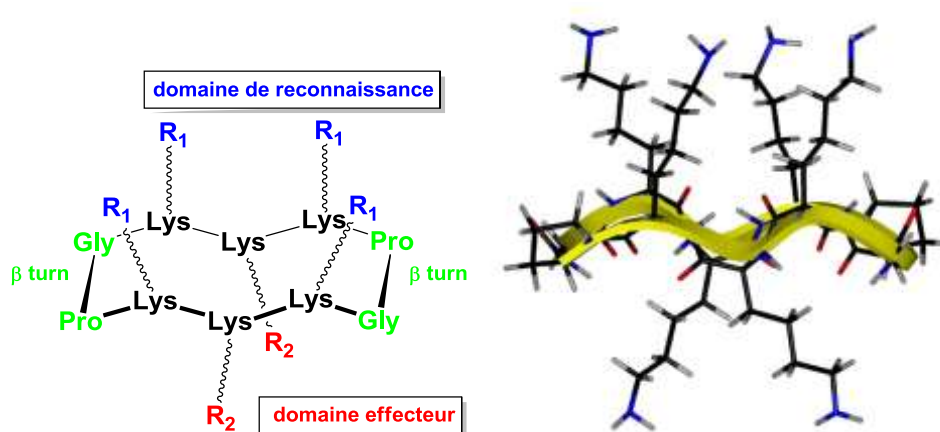


Figure 41. Structure d'un cyclodécapeptide

Ces caractéristiques structurales sont dues à la présence de deux coudes β Proline-Glycine. Ces coudes contraignent la structure en feuillet β antiparallèle et la stabilise donc en solution comme l'ont montré les études de RMN, de modélisation moléculaire.⁶⁸ puis de diffraction

⁶⁷ a) M. Mutter, S. Vuillemier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, 28, 535-554. b) M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razamane, G. Tuchscherer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1482-1485.

⁶⁸ P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter, *Biopolymers* **1996**, 39, 565-574.

des rayons X⁶⁹ (Figure 41). Ce type de contrainte implique que les chaînes latérales des six autres acides aminés, le plus souvent des lysines, soient orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle (quatre dans la partie supérieure, dit domaine de reconnaissance, et deux dans la partie inférieure, dit domaine effecteur), offrant ainsi des sites potentiels d'attachement pour des biomolécules. Les résidus lysines sont particulièrement intéressants car leur chaîne latérale peut être facilement adressée régiosélectivement en utilisant des groupements protecteurs orthogonaux⁷⁰. Ce type de châssis permet donc de contrôler la position et l'orientation des motifs de reconnaissance et effecteurs dans deux espaces séparés topologiquement et offrent par conséquent un outil intéressant pour le développement de glycoclusters.

1.4.9. Applications

Le premier exemple de glycocluster trivalent construit à partir de cyclopeptide a été développé par l'équipe de Kunz en 1996. Il présente une plateforme heptapeptidique cyclique supportant des résidus Sialyl-Le^{x71}. L'acide aminé D-Alanine induit la formation d'un coude β . Les acides aspartiques protégés permettent d'incorporer les résidus saccharidiques. Cette équipe a ensuite développé une seconde structure trivalente avec une plateforme similaire (Figure 42) en incorporant un bras espaceur PEG. Ces deux exemples de molécules ont été testés comme inhibiteurs de sélectines.

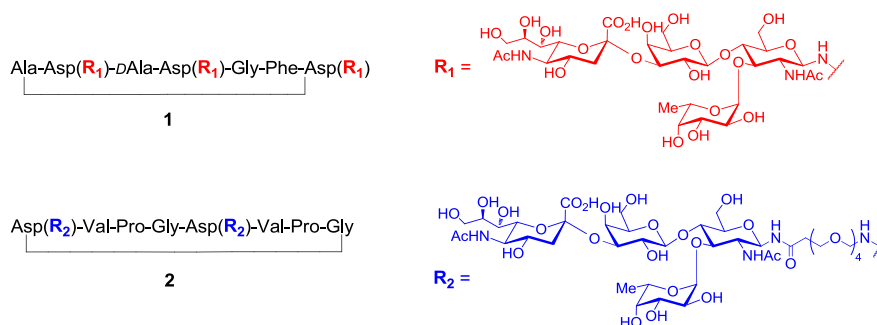


Figure 42. Structure des dérivés cycloheptapeptidiques

Au laboratoire, nous utilisons depuis plusieurs années des cyclodécapeptides pour diverses applications telles la formation de modèles de fibres amyloïdes⁷² (Figure 43a), pour la

⁶⁹S. Peluso, T. Ruckle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma, *ChemBioChem* **2001**, 2, 432-437.

⁷⁰P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1255-1258.

⁷¹U. Sprengard, M. Schudok, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 321-324.

⁷²M. Ouberai, G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1293-1300.

stabilisation et étude de mimes de G-quadruplexes⁷³ (Figure 43b) ou développement d'agents antitumoraux ou marqueurs⁷⁴

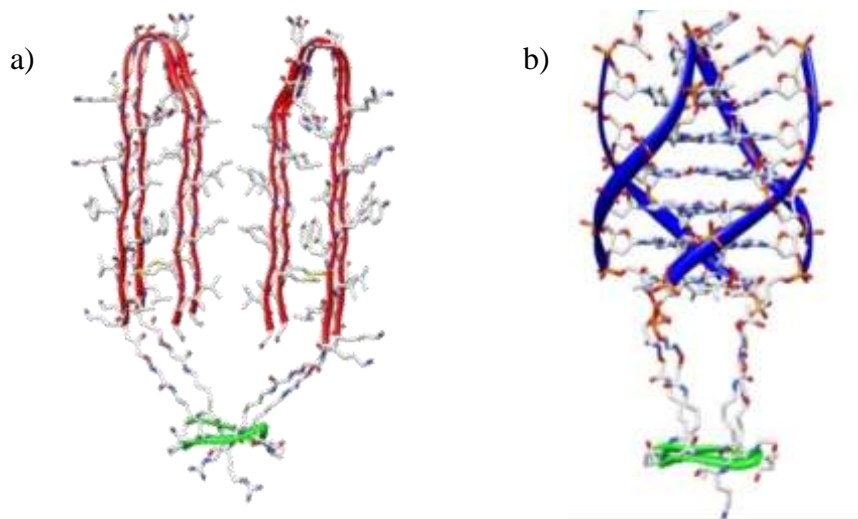


Figure 43. Approche pour l'utilisation du châssis pour des études structurales (a) Modèle de fibres amyloïdes (b) Mimes de G-quadruplexes^{75,76}

Une autre part importante de nos travaux concerne également l'utilisation de ces plateformes pour des applications dans le domaine des glycosciences. Pour cela, nous avons développé des glycoclusters présentant des sucres sur la face supérieure du cyclopeptide, et sur le domaine inférieur des agents de marquage tels que la biotine ou encore la fluorescéine,⁷⁷ ou des peptides immunostimulants⁷⁸ (Figure 44).

⁷³ P. Murat, D. Cressend, N. Spinelli, A. Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy, E. Defrancq, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2588-2591.

⁷⁴ M. Galibert, Z. H. Jin, T. Fukurama, T. Saga, Y. Fujibayashi, P. Dumy, D. Boturyn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5422-5425.

⁷⁵ G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2699-2702.

⁷⁶ P. Murat, R. Bonnet, A. Van der Heyden, N. Spinelli, P. Labbé, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, P. Dumy, E. Defrancq, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6106-6114.

⁷⁷ a) O. Renaudet, P. Dumy, *Open Glycoscience*, **2008**, *1*, 1-7. b) O. Renaudet, P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3619-3622.

⁷⁸ a) S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *5*, 1149-1159. b) O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737-741. c) O. Renaudet, G. Dasgupta, I. Bettahi, A. Shi, A. B. Nesburn, P. Dumy, L. BenMohamed, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11216.

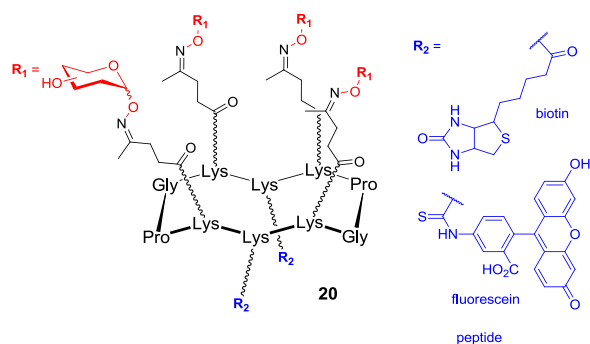


Figure 44. Exemple de glycocluster tétravalent à deux domaines développé au laboratoire.

Plus récemment, une approche similaire a été rapportée par S. J. Danishefsky *et al.* Cette équipe a développé une famille de glycoclusters tétravalents à hexavalents construits sur une plateforme peptidique cyclique contenant quatorze résidus (Figure 45)⁷⁹. Ce support comporte deux coudes β D-proline-L-proline et des antigènes tumoraux Tn et STn conjugués sur des asparagine contenues dans la séquence. L'utilisation d'une cystéine permet enfin l'ancrage de ce composé sur protéine porteuse pour des applications dans le domaine de l'immunothérapie.

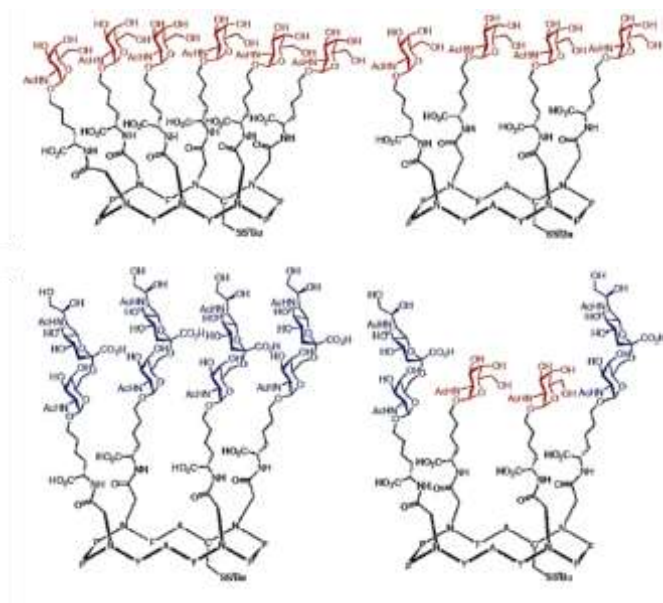


Figure 45. Structure de glycocyclopeptides tétravalents développés par l'équipe de S. J. Danishefsky.

I.5. Objectifs des travaux réalisés

Comme nous l'avons vu dans cette introduction, les structures multivalentes osidiques capables d'interférer efficacement dans les processus biologiques impliquant des interactions

⁷⁹ I. Jeon, D. Lee, I. J. Krauss, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14337-14244.

sucres-protéines présentent de nombreux intérêts diagnostiques et/ou thérapeutiques. Pour ces raisons, les chimistes ont fourni d'énormes efforts ces dernières années pour améliorer leurs méthodes de synthèse et développer des structures plus sophistiquées afin d'améliorer leurs propriétés biologiques.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte. Notre objectif a en effet consisté à développer de nouveaux glycoclusters utilisables pour différentes applications biologiques. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des travaux antérieurs du laboratoire, axés notamment sur des méthodes d'assemblage chimiosélectives développées ces dernières années.

➤ Synthèse de nouveaux glycoclusters (Chapitre 1)

Nos glycoclusters multivalents sont basés sur l'utilisation du cyclodécapeptide précédemment évoqué. Ce peptide cyclique a en effet montré son utilité dans différents contextes notamment comme vaccins synthétiques antitumoraux, mais leurs propriétés de reconnaissance restent modérées envers certaines lectines. Afin d'améliorer leurs propriétés, nous avons développé de nouvelles structures plus sophistiquées, possédant notamment une densité saccharidique plus élevée sur le domaine de reconnaissance ou des peptides et des sucres sur les deux domaines. Pour cela, nous avons exploité plusieurs méthodes de ligation chimiosélectives (ether d'oxime, cycloaddition de Huisgen) et mis au point des processus d'assemblage itératifs utilisant un ou plusieurs de ces liens.

La ligation oxime résulte de la condensation d'une fonction oxyamine avec une fonction aldéhyde ou cétone. La première partie de notre travail a consisté à introduire les fonctions aldéhydes sur le châssis moléculaire et la fonction oxyamine sur le ligand saccharidique totalement déprotégé. Dans le cas de la ligation par méthode CuAAC, qui n'avait jamais été utilisée au laboratoire pour l'assemblage de glycoclusters, les deux partenaires possèdent une fonction alcyne et une fonction azide respectivement. Ici, le sucre a été modifié en position anomérique pour introduire une fonction propargyle et le peptide porteur de la fonction azide.

Ces différents partenaires ont été synthétisés par des méthodes de chimie des sucres traditionnelles mais également par synthèse sur support solide (= SPPS) pour les châssis moléculaires. Ces derniers ont été ensuite modifiés en solution puis ces différents synthons ont été assemblés en biomacromolécule de poids moléculaire allant jusqu'à 11 kDa. Une partie importante de notre travail a ensuite consisté à caractériser ces molécules complexes par spectrométrie de masse et par RMN afin de confirmer la structure exacte de nos constructions.

A l'issue de notre travail de synthèse, 6 molécules tétravalentes, 6 molécules hexavalentes, 20 molécules hexadécavalentes différant par la flexibilité et la nature des bras espaceurs et 4 molécules polyfonctionnelles originales ont été obtenues. La plupart de ces composés ont été étudiés au laboratoire ou dans la cadre de collaboration pour deux types d'applications biologiques différentes.

➤ **Etudes biologiques (Chapitre 2)**

Les glycoclusters offrent des alternatives intéressantes aux traitements antibiotiques traditionnels contre lesquels de plus en plus de bactéries sont résistantes. Dans une première application, nous avons étudié les propriétés de reconnaissance de nos composés présentant une multivalence allant de 4 à 16 résidus oligosaccharidiques. Ces molécules ont été étudiées par diverses méthodes biologiques (tests d'inhibition d'Hémagglutination ou Enzyme-Linked Lectin Assay) avec des lectines modèles (Concanvaline A et UEA-I) et une lectine de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IIL). Nous avons pu identifier une molécule hexadécavalente particulièrement efficace pour la lectine soluble PA-IIL (inhibition à des concentrations subnanomolaires) et également des différences d'inhibitions intéressantes avec plusieurs familles de composés dans le cas de l'UEA-I.

Dans un second projet, des molécules portant 2 à 4 résidus sucres et 2 à 4 séquences peptidiques LELTE ont été étudiées comme activateurs des cellules NK contre des cellules cancéreuses. Ces glycoconjugués ont montré des propriétés extrêmement intéressantes puisqu'elles sont capables de stimuler fortement ces cellules sans provoquer de phénomènes d'auto-apoptose. Ces propriétés uniques font de nos composés des outils prometteurs pour l'immunothérapie antitumorale.

Chapitre 1 :
Stratégie de synthèse de
glycoclusters

II. Stratégies de synthèse de glycoclusters

L'objectif de ma thèse a été de développer une méthode de synthèse afin d'obtenir des glycoconjugués multivalents à partir d'une plate-forme RAFT. Comme il a été précédemment montré, ce type de structure présente deux faces indépendantes qui peuvent être fonctionnalisées orthogonalement. Dans notre approche, la face supérieure est décorée généralement par des épitopes saccharidiques permettant la reconnaissance cellulaire et la face inférieure est fonctionnalisée par des synthons peptidiques ou des agents de marquage. Pour cela, nous avons utilisé des ligations chimiosélectives qui présentent l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et ne nécessitent pas l'utilisation de groupements protecteurs. Nous nous sommes intéressés à deux stratégies : les ligations oxime et/ou triazole (Figure 46).

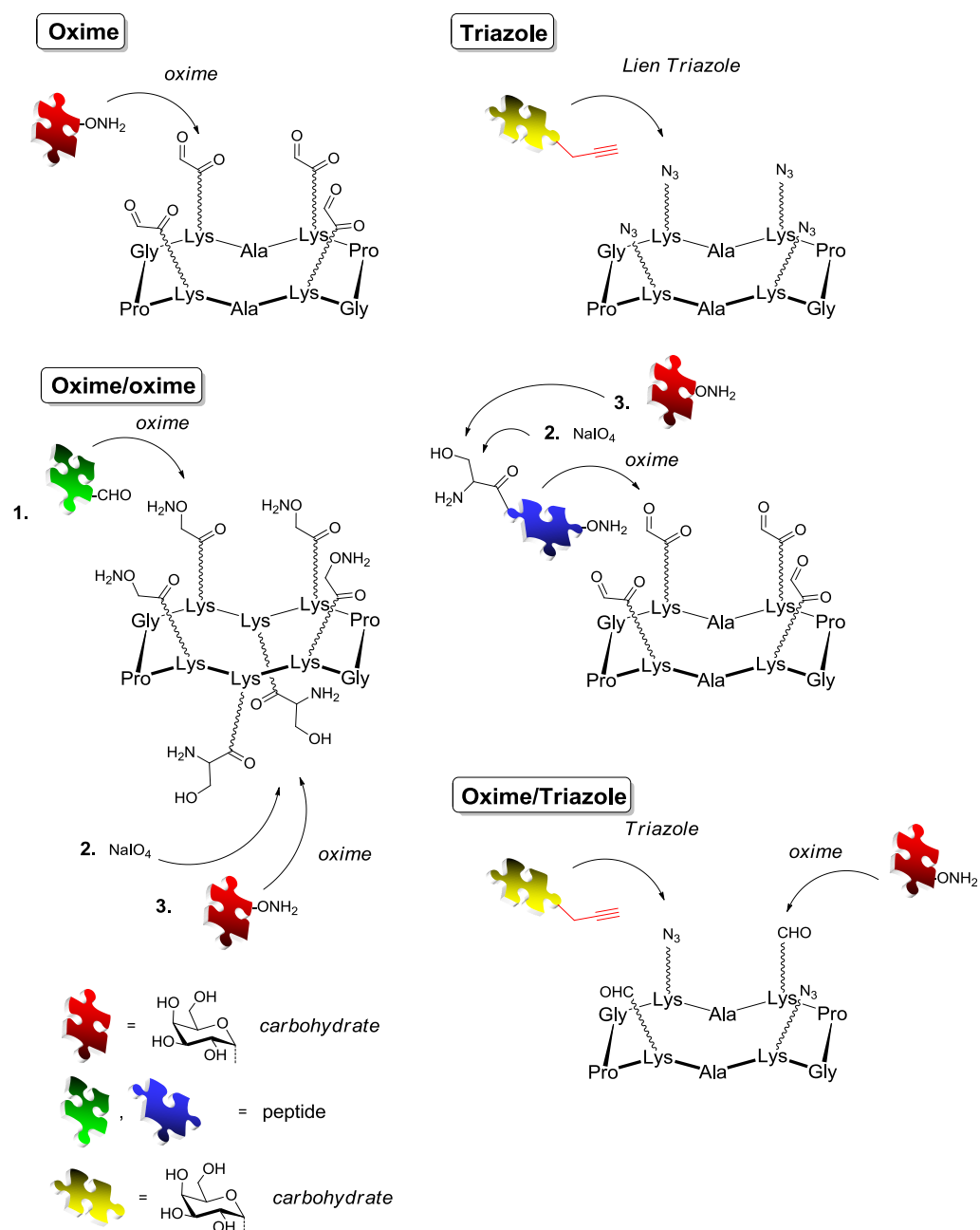


Figure 46. Schéma résumant les différentes stratégies d'assemblages des glycoclusters

Nous avons ainsi préparé plusieurs familles de molécules plus ou moins complexes possédant une composition et une valence variables.

II.1. Les méthodes de ligation chimiosélectives

Il existe de nombreuses méthodes de ligation chimiosélectives. Elles sont idéales pour la construction de biomolécules complexes. Ces ligations sont en effet réalisables en milieu aqueux à des pH proches d'un pH physiologique et compatibles avec la plupart des

groupements fonctionnels présents dans les systèmes biomoléculaires comme les peptides, les oligosaccharides, les oligonucléotides ou encore les protéines⁸⁰.

Ce type de réactions présente l'avantage de ne nécessiter aucune manipulation de groupements protecteurs pour réaliser la dernière étape de l'assemblage. Les ligations chimiosélectives⁸¹ peuvent être classées selon deux catégories : celles conduisant à des liens natifs (comme la Native Chemical Ligation) et celles conduisant des liens non naturels. Parmi ces dernières méthodes, les plus connues sont la cycloaddition de Huisgen, la ligation de Staudinger, cycloaddition de Diels-Alder, la ligation thiol-ène, la formation de liens oxime et hydrazone, ainsi que d'autres ligations non naturelles. Je me suis ici particulièrement attachée à décrire quelques-uns des liens chimiosélectifs utilisés dans la synthèse de glycoconjugués⁸².

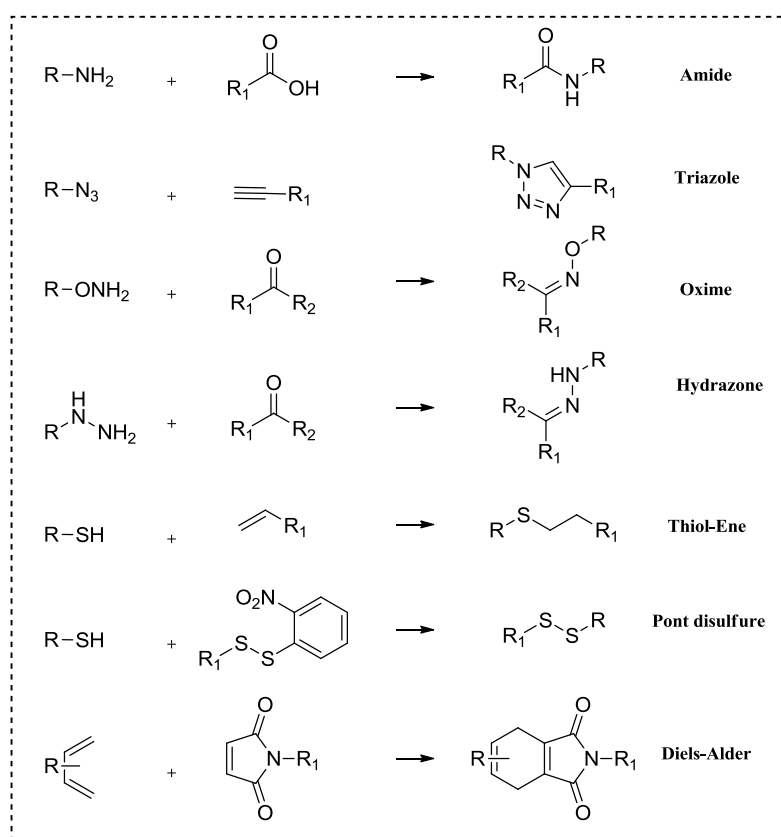


Figure 47. Exemples de ligations chimiosélectives pour le couplage de biomolécules

⁸⁰ T. K. Tiefenbrunn, P. E. Dawson, *Biopolymers* **2009**, *94*, 95-105.

⁸¹ C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030-10074.

⁸² L. L. Kiessling, R. A. Splain, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 619-653.

II.1.1. La cycloaddition de Huisgen

D'abord observée en premier par Michael en 1893, cette réaction a été plus clairement explorée par Huisgen en 1963⁸³. Cette réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne conduit à la formation d'un triazole. L'inconvénient de cette réaction est qu'elle conduit à la formation d'un mélange de deux régioisomères 1,4 et 1,5 en quantité équivalente et nécessite un apport énergétique important (Figure 48).

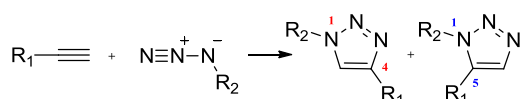


Figure 48. Formation des deux régioisomères 1,4 et 1,5

Finalement, les groupes de Sharpless et Meldal ont montré simultanément en 2002 que l'utilisation de cuivre Cu^I permet de former un seul régioisomère tout en augmentant sa cinétique de formation à température ambiante⁸⁴. Il a été montré qu'elle peut être réalisée en milieu aqueux⁸⁵ et est compatible avec l'utilisation de biomolécules. De plus, les fonctions azotures et alcynes sont relativement faciles à incorporer au sein des biomolécules à associer. Cependant, il existe de nombreuses conditions opératoires qui diffèrent suivant les partenaires de ligation. En effet, la méthode par CuAAC peut être réalisée en présence de différentes sources de cuivre Cu^I (sels de Cu^I en présence d'une base, sels de Cu^{II} en présence d'un agent réducteur, ou nanopoudres de Cu⁰). Le plus souvent, elle est réalisée dans un mélange eau/alcool même si des cosolvants peuvent être additionnés pour une meilleure dissolution des partenaires. Certaines réactions de couplage par CuAAC peuvent nécessiter l'ajout d'un ligand qui va permettre d'augmenter la cinétique de réaction et de protéger les ions Cu^I contre les oxydations. Différents types de ligands peuvent être employés le plus souvent dérivés de la propargylamine, comme la TBTA (= tris(benzyltriazolylméthyle)amine), particulièrement utilisé dans les milieux hydro-alcoolique ou biologique⁸⁶.

Bien que l'utilisation de Cu^I comme catalyseur puisse entraîner des oxydations secondaires sur des chaînes latérales sensibles, cet inconvénient peut aisément être contourné par un temps de réaction plus court et un milieu anaérobie. Ce type de ligation a également été utilisé

⁸³ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-632.

⁸⁴ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

⁸⁵ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

⁸⁶ A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687.

avec succès sur des systèmes biologiques. Cependant, dans ce cas, la toxicité du Cu^{I} pour les cellules représente une limitation majeure⁸⁷. Pour contourner cette difficulté, C. Bertozzi *et coll.* ont mis au point une réaction de cycloaddition auto-induite⁸⁸. Un azoture réagit avec un alcyne incorporé dans un cycle à huit chaînons (Figure 49a). L'alcyne contraint au sein du cycle est ainsi activé par une tension de cycle importante.

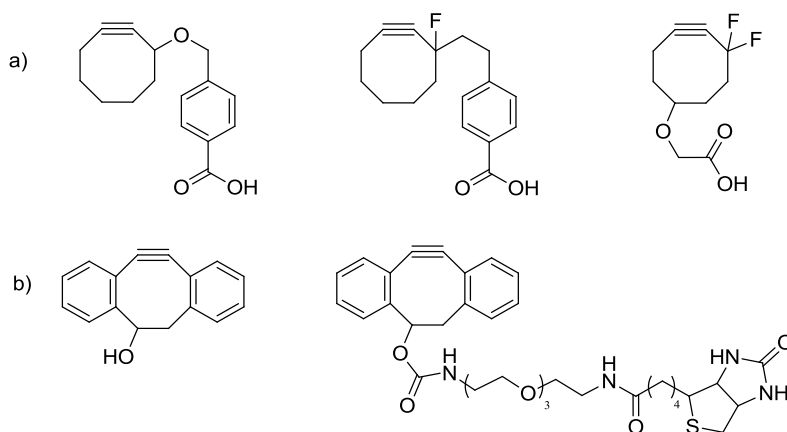


Figure 49. Cyclooctynes étudiés par : a) Bertozzi *et coll.*⁸⁸ et b) Boons *et coll.*⁸⁹

Cette méthode connaît néanmoins des limitations puisqu'elle a une vitesse de réaction lente et un manque de régiosélectivité qui a pu être en partie amélioré par l'introduction de groupements attracteurs⁸⁸. L'équipe de Boons *et coll.* a récemment repris cette méthode de ligation pour marquer efficacement des cellules vivantes en utilisant des dibenzocyclooctynes⁸⁹ (Figure 49b).

⁸⁷ A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498-1500.

⁸⁸ a) N. J. Agard, J. A. Preshar, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047. b) J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.

⁸⁹ X. Ning, J. Guo, A. Wolfert Margreet, G. J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2553-2555.

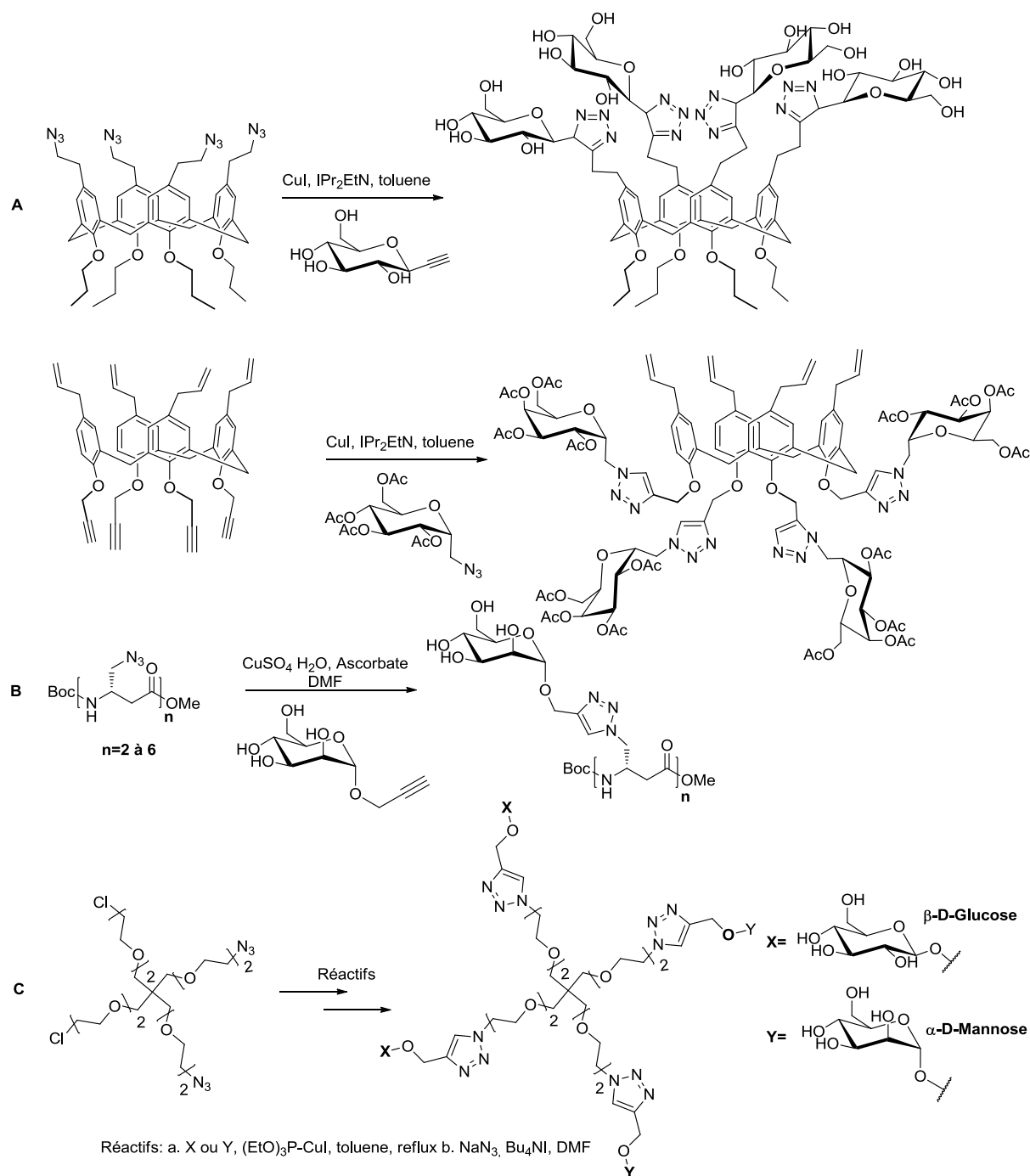


Figure 50. Exemples de synthèse de glycoconjugués par cycloaddition^{90,91,92}

De nombreux glycoconjugués ont été construits par cette méthode de ligation^{26a}. Il a notamment été montré que l'on peut introduire des oligosaccharides déprotégés sur une

⁹⁰ M. Ortega-Munoz, F. Perez-Balderas, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernandez-Mateo, J. Isac-Garcia, F. Santoyo-Gonzalez, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2454-2473.

⁹¹ M. Barra, O. Roy, M. Traïka, C. Taillefumier, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2941-2955.

⁹² A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 4949-4977.

plateforme multivalente. L'équipe d'A. Dondoni et A. Marra^{93,27} a pu ainsi réaliser la synthèse de glycolix-4-arène par cycloaddition entre un calixarène fonctionnalisé par 4 alcynes ou 4 azotures et un sucre portant soit un groupement azoture soit une fonction alcyne sur le carbone anomérique en présence de Cu^I (Figure 50a). D'autres architectures à base de polymères peuvent également être obtenues en suivant une méthode de ligation comparable (Figure 50b). Un autre exemple intéressant décrit par l'équipe de F. Santoyo-Gonzalez rapporte la synthèse d'un hétéroglycoconjugué en réalisant des ligations successives de deux saccharides différents par cycloaddition. Dans ce cas, la réaction a été réalisée en utilisant un complexe de Cu^I (Figure 50c).

II.1.2. La formation du lien oxime

La réaction entre une fonction carbonyle (aldéhyde/cétone) et une oxyamine conduit à la formation d'un éther d'oxime. Ce type de réaction a été étudiée pour la première fois en 1959⁹⁴ puis utilisée bien plus tard par K. Rose pour la synthèse de protéines de haut poids moléculaire⁹⁵. Cette ligation présente de nombreux intérêts. La formation du lien oxime se déroule dans des conditions aqueuses légèrement acides (pH 3-4) et est généralement quantitative avec une cinétique de réaction rapide. De plus, ce lien est stable dans une gamme de pH allant de 2 à 9 (voir § caractérisation des molécules) et en milieu biologique⁹⁶. Un des premiers exemples de glycosylation a été décrit par Mutter *et coll.* pour la synthèse d'un analogue de la somatostatine RC-160⁹⁷. Dans cet exemple, les auteurs ont utilisé un peptide fonctionnalisé par un groupe oxyamine qui a été condensé avec l'extrémité réductrice aldéhyde d'un disaccharide. Un grand nombre d'exemples ont ensuite été décrits par différents groupes⁹⁸. En particulier, l'équipe de C. R. Bertozzi a montré d'abord sur des glycopeptides puis des systèmes plus complexes tels que des nanotubes de carbones et des systèmes biologiques⁹⁹. Un des exemples récents de ce groupe¹⁰⁰ a montré qu'il est possible

⁹³ A. Dondoni, A. Marra, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546-7557.

⁹⁴ W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.

⁹⁵ K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

⁹⁶ N. Spinelli, O. P. Edupuganti, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 219-222.

⁹⁷ S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1230.

⁹⁸ a) F. Peri, A. Deutman, B. L. La Ferla, F. Nicotra, *Chem. Commun.* **2002**, 1504-1505. b) M. R. Carrasco, R. T. Brown, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8853-8858. c) M. R. Carrasco, R. T. Brown, V. H. Doan, S. M. Kandel, F. C. Lee, *Biopolymers* **2006**, *84*, 414-420.

⁹⁹ a) E. C. Rodriguez, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905-9906. b) E. C. Rodriguez, L. A. Marcaurrelle, C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7134-7135.

¹⁰⁰ J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10360-10365.

de suivre l'embryogenèse de poissons Zébra via les résidus sialylés de la surface cellulaire par un processus d'oxydation et marquage par un composé fluorescent oxyaminé (Figure 51).

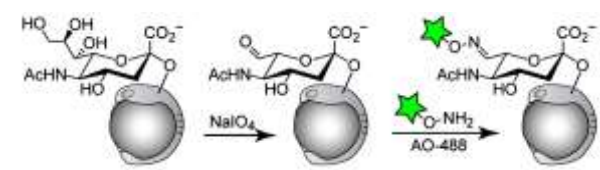


Figure 51. Réaction d'oximation *in vivo* par l'équipe de Bertozzi et coll.

Cependant, cette ligation peut être longue avec un rendement faible à pH physiologique pouvant limiter son utilisation *in vivo*. Dans une étude récente, Dawson *et coll.*¹⁰¹ ont montré l'utilisation d'aniline peut servir de catalyseur durant la formation d'éthers d'oxime¹⁰² (Figure 52). En effet, ceci permet la formation d'une quantité significative de la base de Schiff correspondante à pH 7 évoluant rapidement à la formation du produit attendu.

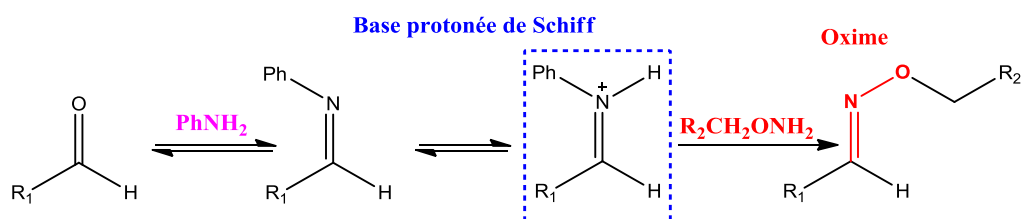


Figure 52. Formation d'un lien oxime en présence d'aniline

La cycloaddition de Huisgen et la ligation oxime sont les deux méthodes que nous avons choisis d'utiliser pendant ma thèse pour la synthèse de glycoconjugués multivalents.

II.2. Synthèse des unités osidiques modifiés

Pour réaliser ces réactions, nous avons choisi de fonctionnaliser les oligosaccharides en position anomérique soit par une fonction oxyamine soit par une fonction propargyle. La fonctionnalisation sur le carbone anomère permet de conserver la configuration du lien après ligation. Ceci permet d'introduire la fonction réactive dans une configuration précise et qui ne sera pas modifié après ligation.

¹⁰¹ a) A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *118*, 7743-7746. b) A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *46*, 7581-7584.

¹⁰² A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602-15603.

II.2.1. Les sucres oxyamines

L'incorporation d'une oxyamine sur les sucres est généralement réalisée à partir d'un groupement oxysuccinimide ou oxyphthalimide. Quelques méthodes utilisant le N-hydroxysuccinimide (HOSuc) ou le N-hydroxy-phthalimide (HOPht) comme agent nucléophile lors de glycosylation ont été décrits dans la littérature¹⁰³. Jurczak *et coll.* ont réalisé des réactions 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 SN₂ (inversion de configuration) par absence d'assistance anchimérique. Une autre méthode pour obtenir ce type de dérivés est rapportée par R. Roy en 1995¹⁰⁴. Il décrit une méthode de glycosylation stéréosélective par une réaction de transfert de phase entre un halogénure de glycosyle et du N-hydroxysuccinimide (NHS), dont la faible acidité de l'hydrogène (pKa ≈ 6) est compatible avec ces conditions opératoires (Mélange biphasique Na₂CO₃/CH₂Cl₂). Plus récemment, C. R. Bertozzi¹⁰⁵ a montré que les sucres qui possèdent la fonction 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 laboratoire¹⁰⁶. La stratégie est représentée sur la figure suivante :

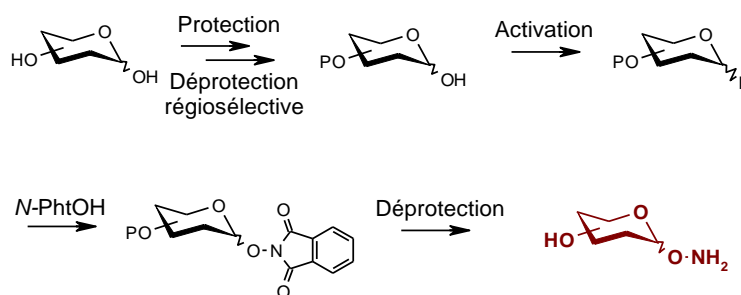


Figure 53. Stratégie générale pour la synthèse des sucres oxyamines.

Cette 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

¹⁰³ E. Grochowski, J. Jurczak. *Carbohydrate Res.* **1976**, 50, C15-C16.

¹⁰⁴ S. Cao, F. D. Tropper, R. Roy, *Tetrahedron* **1995**, 51, 6679-6686.

¹⁰⁵ a) E. C. Rodriguez, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7134-7135. b) E. C. Rodriguez, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9905-9906.

¹⁰⁶ O. Renaudet, *Thèse de doctorat*, **2002**, Université Joseph Fourier de Grenoble.

atome de fluor (plus stable qu'un bromure de glycosyle) ; (iii) glycosylation du sucre donneur par le *N*-hydroxy-phthalimide, équivalent masqué de la fonction oxyamine ; (iv) déprotection des alcools et libération de l'oxyamine. Cette stratégie permet d'accéder avec de bons rendements aux dérivés α et β oxyamines, dont la proportion dépend de la nature des groupements protecteurs utilisés.

Nous avons synthétisé différents motifs : des ligands de diverses protéines comme le lactose, le fucose, le mannose et les parties osidiques des marqueurs anti-tumoraux, Tn et TF. Ceci permettra d'avoir un choix plus étendu sur les cibles et notamment les lectines qui sont extrêmement spécifiques envers leur ligand.

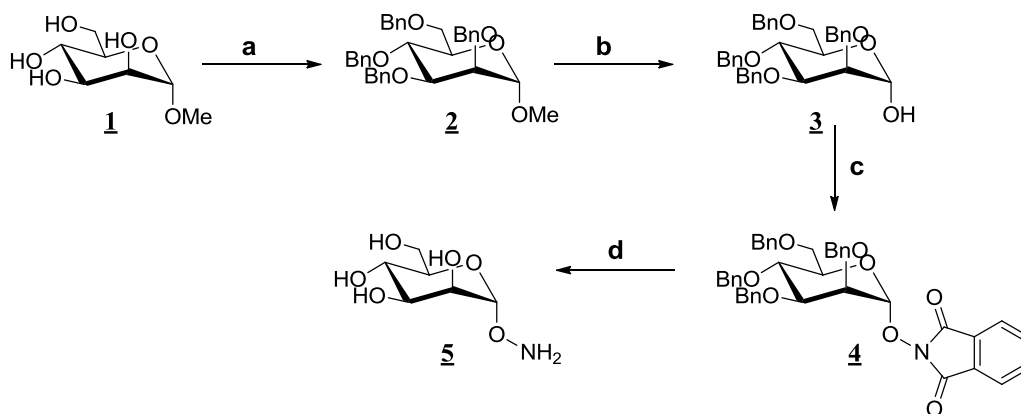
a. Synthèse du dérivé α -mannose oxyamine 5

Le D-Mannose est un dérivé saccharidique qui présente un intérêt comme ligands de lectines végétales ou bactériennes ou le ciblage avec des cellules dendritiques. La synthèse débute par la protection des groupements hydroxyles. Nous avons tout d'abord utilisé des acétyles comme groupements protecteurs (Figure 54). Bien que la réaction de glycosylation ait parfaitement fonctionné, des problèmes d'élimination sont survenus lors de l'étape finale de déprotection. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'utiliser des groupements benzyles pour réaliser cette synthèse. Cette réaction est réalisée à partir d' α -D-mannopyrannoside de méthyle commercial 1¹⁰⁷ par traitement successif avec du NaH puis du bromure de benzyle. Le dérivé protégé 2 obtenu est traité en milieu acide par un mélange acide acétique / acide sulfurique 1M (4/1) à 70 °C pour libérer la position anomérique. Le composé obtenu 3 peut être glycosylé directement sans activation préalable. La glycosylation est réalisée en présence d'étherate de trifluorure de bore¹⁰⁸ (BF₃.Et₂O) qui est l'un des promoteurs les plus couramment employés avec les fluorures de glycosyles. Cette étape est réalisée dans le dichlorométhane en présence d'une base (triéthylamine), du composé 3 et de HOPht en quantité stoechiométrique. Le BF₃.Et₂O en excès (2-4 équivalents) est ajouté en dernier pendant 12 heures environ. Le produit 5 est obtenu après purification sur gel de silice avec un rendement de 67%. Le même composé peut être obtenu après activation préalable avec un atome de fluor en présence de DAST¹⁰⁹. Dans ce cas, la réaction est plus rapide (30 min) mais les rendements restent comparables aux conditions précédentes.

¹⁰⁷ J. S. Brimacombe, *Methods in Carbohydr. Chem.* **1972**, 6, 376-378.

¹⁰⁸ H. Kunz, W. Sager, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 283-287.

¹⁰⁹ G. J. Posner, S. R. Haines, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5-8.



Réactifs: a. NaH, BnBr, DMF, 60% b. AcOH, H₂SO₄ 1M, 70°C, 78% c. PhthOH, BF₃·Et₂O, CH₂Cl₂, TEA, 67%
d. i) H₂, Pd/C 10%, MeOH, ii) MeNHNH₂, EtOH, 12h, R(i+ii)=40%

Figure 54. Synthèse du dérivé mannose oxyamine

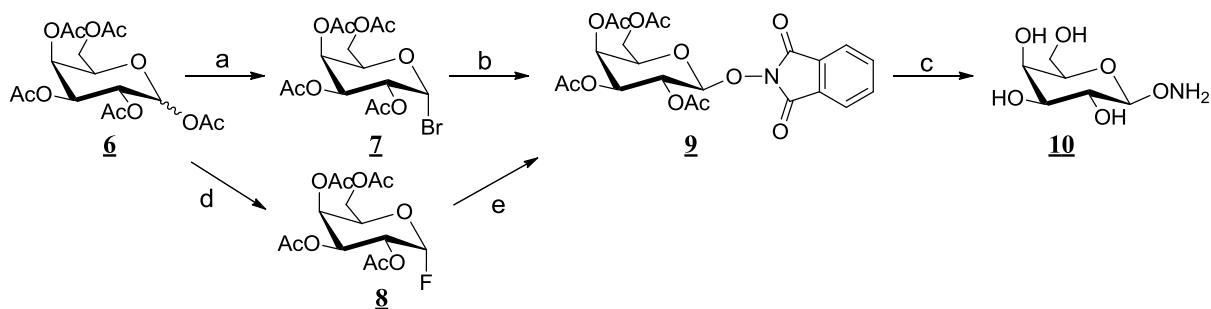
Le produit **4** est déprotégé en deux étapes successives. Les groupements benzyles sont éliminés par une étape d'hydrogénation catalytique sur charbon dans le méthanol. Cette étape est particulièrement délicate à contrôler en raison des risques de coupure de la liaison N-O sensibles aux conditions réductrices. La réaction est donc stoppée avant qu'elle ne soit complète pour limiter la formation du produit secondaire ce qui explique la faible conversion de cette étape. La fonction oxyamine est finalement libérée par coupure du phthalimide par action de la méthyldiazine et purifié par chromatographie sur gel de silice pour conduire au composé **5**.

b. Synthèse du *O*-β-galactose oxyamine **10**^{110,111}

Le D-galactose et le D-lactose sont des ligands connus du récepteur ASGPR ou des galectines dont nous évoquerons l'intérêt dans le chapitre 2.

¹¹⁰ a) O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2628-2636; b) E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402-2410.

¹¹¹ O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7575-7578.



Réactifs: a. HBr, 30% dans AcOH, CH₂Cl₂, 67% b. Pht-OH, TBHAS, Na₂CO₃, CH₂Cl₂, 66% c. MeHNNH₂, EtOH d. i) AcNHNH₂, DMF, 50°C, 1h, 88% ii) DAST, THF, 30 min, 70% e. Pht-OH, BF₃-Et₂O, Na₂CO₃, CH₂Cl₂, 66%

Figure 55. Synthèse du *O*-β-*D*-galactopyrannosyl oxyamine

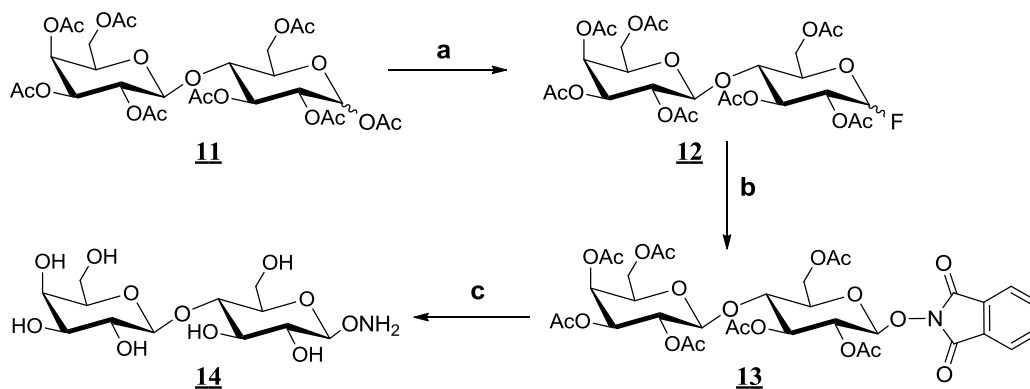
Les groupements hydroxyles sont ici protégés par des acétates en présence d'anhydride acétique/pyridine (1/2) (Figure 55). La position anomérique est ensuite activée à 0°C par l'acide bromique dans l'anhydride acétique à 33% pour obtenir le dérivé bromé **7**¹¹². Nous avons tout d'abord utilisé la réaction de catalyse par transfert de phase (=PTC) décrite par René ROY qui conduit à la formation régiosélective du régioisomère β en raison de la présence d'un groupement participant en C-2. Cette glycosylation se déroule en présence d'hydrogénosulfure de tétrabutylammonium comme agent de transfert de phase avec de HOPht dans une solution de carbonate de sodium. Nous obtenons ainsi le produit **9** avec un rendement de 66% après une nuit d'agitation. La synthèse du même produit a été réalisée selon le protocole développé au laboratoire. La déprotection de la position anomérique est réalisée en présence d'acétate d'hydrazine dans le DMF à 50°C en une heure¹¹³. Cette méthode s'est avérée plus efficace que la réaction décrite précédemment utilisant un mélange composé d'éthylène diamine et d'acide acétique. En effet, dans ces conditions, un rendement plus faible et un temps de réaction plus long sont généralement observés. Le dérivé **8** est obtenu par activation par le DAST dans le THF anhydre puis glycosylé par le HOPht dans les conditions décrites précédemment. Le rendement de glycosylation est comparable à celui obtenu par PTC. La déprotection finale se déroule en présence de méthylhydrazine¹¹¹ qui permet de libérer les fonctions hydroxyles des acétates et la fonction oxyamine. Le composé **10** est obtenu avec un rendement de 65% après une simple précipitation dans un mélange méthanol/CH₂Cl₂.

¹¹² R. U. Lemieux, *Meth. Carbohydrate Res.* **1963**, 2, 23.

¹¹³ G. Escoffier, D. Gagnaire, J. O. Utille, *Carbohydrate Res.* **1975**, 39, 375.

c. Synthèse du β -lactose oxyamine **14**

La synthèse du dérivé lactose **14** a été réalisée comme précédemment en passant par une activation au fluorure suivie d'un glycosylation par le HOPht (Figure 56). Après déprotection, le dérivé lactose oxyamine **14** est obtenu après précipitation avec un rendement de 60%.

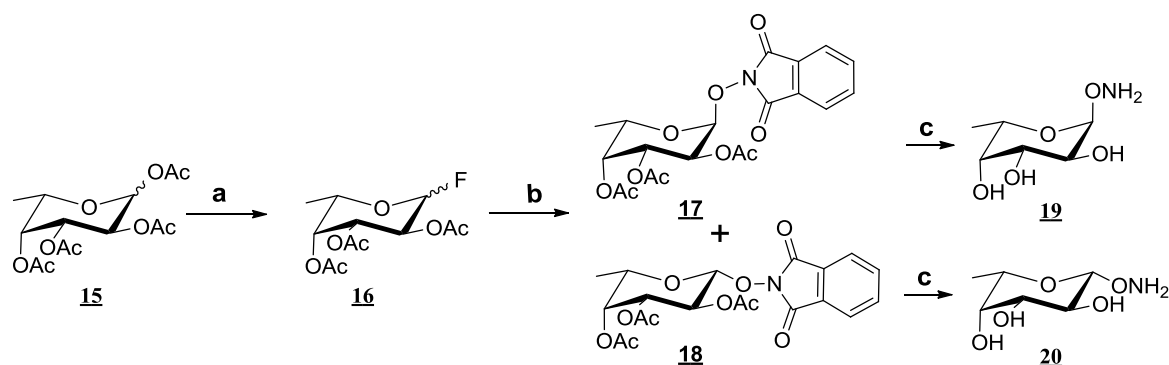


Réactifs: a. i) AcNH-NH_2 , DMF, 50°C , 1h, 85 %; ii) DAST, THF, Ar, 30 min, quantitatif b. PhOH, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , TEA, 70%. c. MeNHNH_2 , EtOH, 12h, 60%.

Figure 56. Synthèse du lactose oxyamine

d. Synthèse du O - α/β -D-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. Comme nous le verrons un peu plus tard, il constitue une cible de choix pour le développement d'agents anti-bactériens.



Réactifs: a. i) EDA/AcOH, THF ii) DAST, THF, 30 min, 87% b. Pht-OH, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, TEA, CH_2Cl_2 , 85% c. MeHNNH_2 , EtOH, 70%.

Figure 57. Synthèse de l'*O*-α/β-D-fucopyranosyl-oxyamine¹¹⁴

Comme précédemment, la première étape est une protection intégrale des hydroxyles du fucose par acétylation. La formation successive des dérivés fluoré et α/β-phthalimido est réalisée selon la méthode de synthèse précédemment décrite (Figure 57). Bien qu'on puisse s'attendre à une assistance anchimérique grâce à la présence d'un groupement acétyle en C2, les deux anomères α/β **17** et **18** sont obtenus pendant cette réaction avec un rendement de 85%. Ils sont séparés par chromatographie sur gel de silice (α : 35%, β : 50%) puis déprotégé finalement par la méthylhydrazine. Finalement, le dérivé *O*-α-D-fucopyranosyl-oxyamine **19** est obtenu par cristallisation dans l'éthanol absolu avec un rendement de 77% et le *O*-β-D-fucopyranosyl-oxyamine **20** avec un rendement de 70%. L'efficacité de la synthèse de ces deux dérivés a été contrôlée puis publiée dans l'ouvrage publié en 2011 par Paul Kovac intitulé : *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods Volume 1*¹¹⁵.

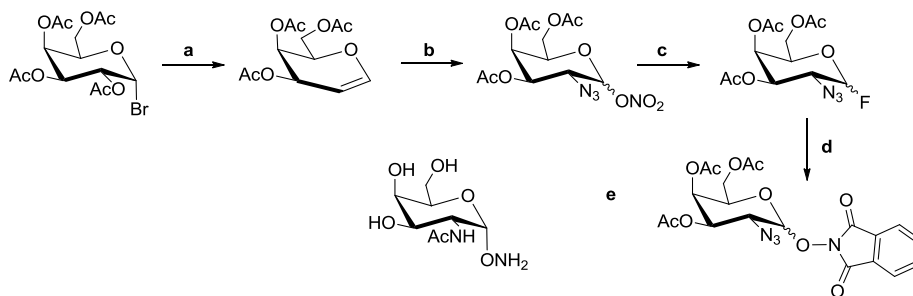
e. Synthèse de l'antigène osidique Tn oxyamine

L'antigène Tn fait partie de la famille des mucines et est constituée d'une unité GalNAc associée sur la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine par un lien α-anomère¹¹⁶. On le trouve surexprimé à la surface de certaines tumeurs et constitue un élément structural essentiel pour la conception de vaccins synthétiques anti-cancéreux. Nous avons montré au laboratoire que seule la partie GalNAc peut être utilisée pour ce type d'applications⁷⁸. Nous avons donc synthétisé ce dérivé portant une fonction oxyamine en position anomérique.

¹¹⁴ V. Duléry, O. Renaudet, C. Philouze, P. Dumy, *Carbohydrate Res.* **2007**, 342, 894-900.

¹¹⁵ I. Bossu, B. Richichi, P. Dumy, O. Renaudet, *Synthesis of α- and β-L-fucopyranosylhydroxylamines*, **2011**, CRC Press.

¹¹⁶ T. Ju, V. I. Otto, R. D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2-24.



Réactifs: a. Zn, Acétone, NaH₂PO₄, 71% b. CAN, NaN₃, CH₃CN, -15°C, 72% c. i) NaNO₂, dioxane/H₂O, 80°C, 70%
 ii) DAST, THF, 30 min, 80% d. Pht-OH, BF₃.Et₂O, TEA, CH₂Cl₂, 37% pour α e. i) Pd/C, MeOH/Ac₂O, 32% ii) MeHNH₂, EtOH, 60%

Figure 58. Synthèse de l'antigène Tn oxyamine

La première étape consiste en une élimination réductrice à partir du produit bromé **7** en présence de zinc dans une solution acétone/acide phosphorique avec un rendement de 71%¹¹⁷ (Figure 58). Grâce à la réaction d'azidonitration décrite par Lemieux en 1979¹¹⁸, le D-Galactal **21** est fonctionnalisé pour conduire au dérivé **22** avec un rendement de 72%. L'hydrolyse de ce composé permet d'introduire l'atome de fluor par action du DAST pour former l'intermédiaire **23** avec un rendement de 80%. Dans les mêmes conditions que précédemment, la glycosylation par le HOPht est réalisée pour conduire à un mélange anomère **24a** et **24b**. Après chromatographie sur gel de silice l'anomère α **24a** attendu est obtenu avec un rendement de 37% (anomère β : 50%). Le groupement azoture est ensuite réduit par hydrogénation catalytique puis acétylé *in situ* en présence d'anhydride acétique avec un rendement de 53%. Finalement, le composé **25** est obtenu après déprotection avec un rendement de 60%.

f. Synthèse de l'antigène osidique TF oxyamine

L'antigène TF (Thomsen-Friedenreich) est lui aussi issu de la famille des mucines¹¹⁹. Il contient une unité galactose lié en β -(1 \rightarrow 3) à l'antigène Tn. Ce disaccharide représente également une structure importante pour le développement de vaccins synthétiques mais également comme ligands de lectines (cf. Chapitre 2).

¹¹⁷ J. Zhao, S. Wei, X. Ma, H. Shao, *Carbohydrate Res.* **2010**, 345, 168-171.

¹¹⁸ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliff, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1251.

¹¹⁹ J. P. Richardson, D. Macmillan, *Glycoscience* **2008**, *Mucin-Based Vaccines*.

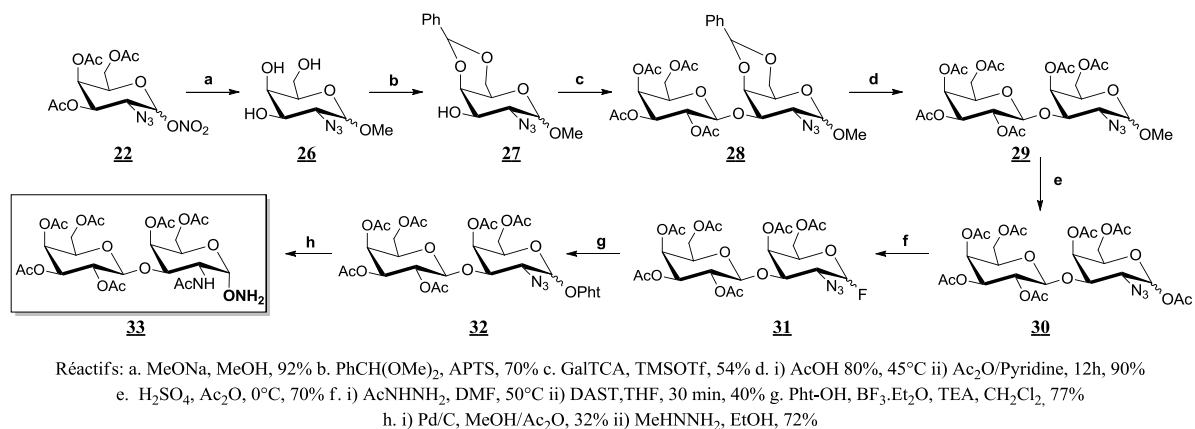


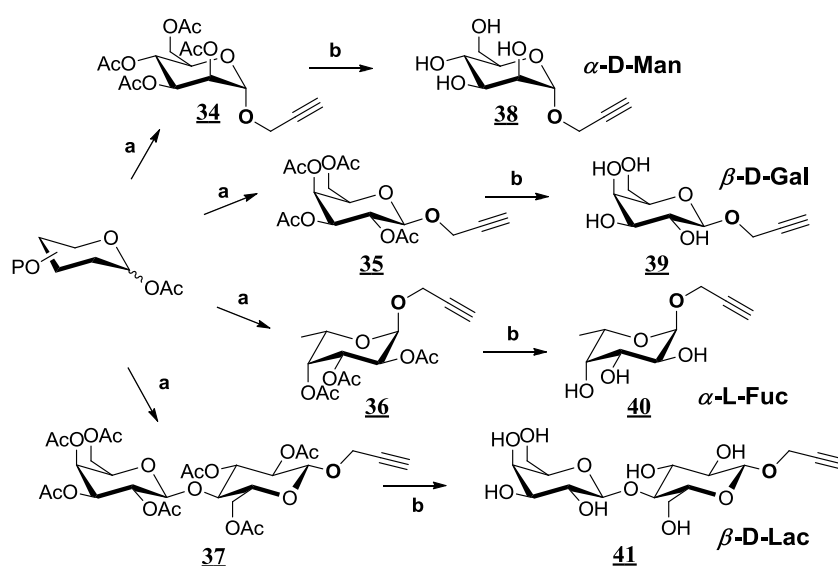
Figure 59. Synthèse du TF oxyamine

La formation de ce dissaccharide nécessite la préparation du sucre azidonitré **22** à partir du galactal **21** (Figure 59). Après déprotection des groupements acétylés par action du méthanolate de sodium dans le méthanol, le composé **26** est protégé sélectivement par un groupement benzaldéhyde en catalyse acide en positions 4 et 6. La glycosylation est réalisée entre ce sucre accepteur **27** et le galactose donneur activé par un TCA en présence de TMSOTf dans du CH₂Cl₂ anhydre. On obtient le dissaccharide β (1→3) **28** attendu avec un rendement de 54% après purification par chromatographie sur gel de silice. Ce dissaccharide est ensuite déprotégé en positions 4 et 6 par hydrolyse acide puis acétylé. Le carbone anomérique est déprotégé et acétylé *in situ* dans un mélange H₂SO₄/Ac₂O à 0°C. La désacétylation de la position anomérique dans les conditions décrites précédemment permet d'introduire le fluorure pour conduire au composé **31**. Le groupement phthalimide est introduit par glycosylation. On obtient le composé **32** sous forme d'un mélange anomérique en raison de la présence d'un groupement azoture non participant en C-2. L'anomère α est isolé par chromatographie sur colonne avec un rendement de 38%. Le groupement azoture en position 2 est alors réduit et acétylé *in situ* dans les mêmes conditions que pour l'antigène Tn. Finalement, une étape de déprotection par action de la méthylhydrazine est réalisée pour obtenir le produit attendu **33** avec un rendement de 72% après purification par précipitation dans un mélange MeOH/CH₂Cl₂.

II.2.2. Les sucres propargylés

Afin de réaliser des glycoconjugués par la méthode CuAAC, nous avons introduit en position anomérique l'alcool propargylique au lieu de la fonction oxyamine. Trois méthodes de

glycosylation ont été développées pour la préparation de ces dérivés. L'une des voies de synthèse possible est une glycosylation classique de type Fisher à partir de sucres libres en présence d' H_2SO_4 -Silice¹²⁰. Cette réaction semble offrir une excellente stéréosélectivité mais une étude plus récente de Fairbanks¹²¹ rapporte des problèmes de reproductibilité et de stéréosélectivité. La seconde repose sur une glycosylation à partir de sucres activés soit par un halogène¹²² soit un groupement trichloroacétimide¹²³. La dernière méthode de glycosylation catalysée par un acide de Lewis est réalisée à partir de précurseurs peracétylés¹²⁴. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser cette dernière méthode pour synthétiser les dérivés mannose, galactose, fucose et lactose (Figure 60).



Réactifs: a. alcool propargylique, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 70%; b. MeONa , MeOH , 2h, quantitative

Figure 60. Les différents dérivés saccharidiques propargyl

Comme pour la synthèse des sucres oxyamines, les groupements hydroxyyles ont été protégés par des acétates. En effet, ici l'introduction de groupements benzyles n'est pas judicieuse en raison de la sensibilité de la fonction alcyne dans des conditions réductrices nécessaires à la débenzylation. La glycosylation est directement réalisée sans activation préalable de la position anomérique qui nous permet ainsi une synthèse en trois étapes, en présence d'un excès d'éthérate de trifluorure de bore ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) et d'un large excès d'alcool propargylique.

¹²⁰ H. B. Mereyala, S. R. Gurrula, *Carbohydrate Res.* **1998**, 307, 351-354.

¹²¹ K. K. Yeoh, T. D. Butters, B. L. Wilkinson, A. J. Fairbanks, *Carbohydrate Res.* **2009**, 344, 586-591.

¹²² M. Horisberger, B. A. Lewis, F. Smith, *Carbohydrate Res.* **1972**, 23, 144-147.

¹²³ E. F. Megia, J. Correa, I. Rodriguez-Meizoso, R. Riguera, *Macromolecules* **2006**, 39, 2113-2120.

¹²⁴ a) R. J. Kaufman, R. S. Sidhu, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4941-4947. b) R. Roy, S. K. Das, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Z. Gan, *Synthesis* **2001**, 7, 1049-1052.

L'assistance anchimérique due à la présence du groupement acétyl en C-2 oriente la réaction pour conduire à la formation de l'anomère β en série Lactose **37** et Galactose **35** et α en série Mannose **34**. Comme dans le cas de la glycosylation par le groupement phthalimide, la réaction conduit à la formation des deux anomères en série fucose séparés par chromatographie sur gel de silice. Finalement, les produits sont déprotégés dans les conditions de Zemplén¹²⁵ par du méthanolate de sodium dans le méthanol en deux heures. Les composés propargylés **38** à **41** sont obtenus avec des rendements quantitatifs.

II.3. Synthèse des glycoclusters

Comme il a été mentionné auparavant, le cyclodécapeptide possède deux coudes β proline-glycine qui contraignent la structure et permettent de définir deux domaines d'adressage situés de part et d'autre du plan moyen du cycle. Des résidus lysines sont utilisés comme point d'ancrage pour les différents éléments à assembler. La synthèse du peptide linéaire est réalisée sur support solide par SPPS selon une stratégie Fmoc/*t*-Bu de l'extrémité C-terminale à N-terminale. L'élongation du peptide est réalisée en présence d'un agent de couplage, généralement le PyBOP. La résine choisie est acido-labile pour conserver les groupements protecteurs des acides aminés lors de la cyclisation (Figure 61). De plus, la séquence du peptide débute par une Glycine en position C-terminale afin d'éviter d'épimérisation qui pourrait survenir si la cyclisation était réalisée sur un acide aminé chiral.

¹²⁵ G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, 62, 1613.

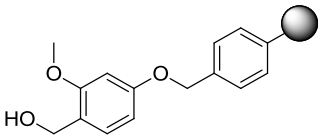
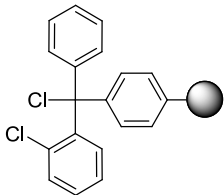
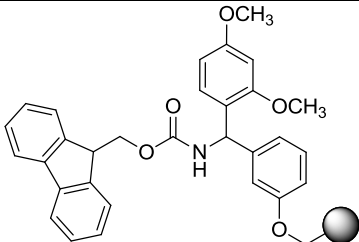
| Résines | Conditions de coupure | Support disponible |
|--|---|---------------------|
|  <p>SASRIN®</p> | 1% TFA/CH ₂ Cl ₂ | Polystyrène |
|  <p>Chlorotriyl</p> | 0,5% TFA/CH ₂ Cl ₂ AcOH/CH ₂ Cl ₂ /TFE | Polystyrène |
|  <p>Rink Amide</p> | 95% TFA | Polystyrène ou PEGA |

Figure 61. Structures de différentes résines acido-labiles

II.3.1. Assemblage par stratégie oxime

a. Synthèse du châssis fonctionnalisé par quatre aldéhydes

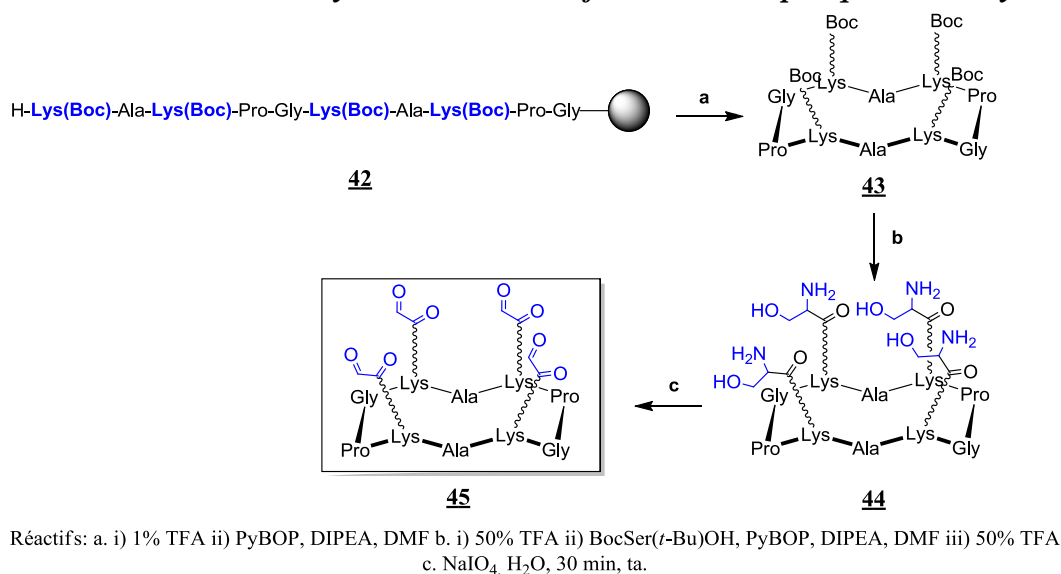


Figure 62. Synthèse du cyclodécapeptide **45**

La résine est tout d'abord gonflée dans le CH₂Cl₂ puis dans le DMF. La synthèse est ensuite réalisée par succession de cycles de déprotection et couplages classiques en SPPS. La déprotection des acides aminés est réalisée par une solution de pipéridine/DMF (1:5). Le taux de chargement de la résine peut être évalué grâce à un dosage UV des solutions de coupure des groupements Fmoc à 299 nm contenant l'adduit dibenzofluvène/pipéridine, ce qui permet de contrôler l'efficacité de l'élongation. Les acides aminés N- α -protégés sont couplés en présence de 4 équivalents de DIPEA et de 2 équivalentes de PyBOP dans le DMF. Après chaque couplage, la résine est lavée plusieurs fois par du DMF et du CH₂Cl₂ et un test colorimétrique TNBS permet de confirmer l'efficacité de la réaction¹²⁶ (Figure 62).

Après l'élongation du peptide linéaire **42** (Figure 62), la résine est coupée avec une solution faiblement acide (1% de TFA). Le peptide **42** est alors cyclisé dans un milieu de haute dilution en milieu basique (pH 8) et en présence de PyBOP dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (1:5). Ces conditions de hautes dilutions permettent de prévenir des réactions de polymérisation et donc de favoriser la réaction de cyclisation intramoléculaire. Les chaînes latérales des lysines du composé **43** sont alors totalement déprotégées en présence d'une solution à 50% TFA. Le peptide est ensuite précipité à l'éther sous forme d'une poudre blanche et récupéré après centrifugation. Une méthode efficace pour incorporer des fonctions

¹²⁶ W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261-264.

aldéhydes complémentaires des fonctions oxyamines consiste à utiliser une sérine comme équivalent masqué d'aldéhyde¹²⁷. Les sérines protégées par des groupements Boc et *t*-Bu sont donc adressées sur les chaînes latérales de lysines en présence de DIPEA (pH 8) et de PyBOP dans le DMF. Leur déprotection en présence de TFA et d'eau comme piègeur de carbocations conduit à la libération de fonctions aminoalcools (composé **44**) qui peuvent être oxydées par le périodate de sodium pour former le châssis moléculaire **45**. Après 30 min, le peptide est directement purifié par HPLC semi-préparative pour éliminer l'excès de périodate de sodium et le formaldéhyde libéré lors de la réaction. Le composé **45** est obtenu avec un rendement de 73%.

b. Assemblage des glycoclusters tétravalents

Le châssis moléculaire **45** est donc fonctionnalisé par les unités osidiques oxyamines précédemment obtenues (Figure 63). Une famille de six glycoconjugués **46** a pu être synthétisée par cette stratégie.

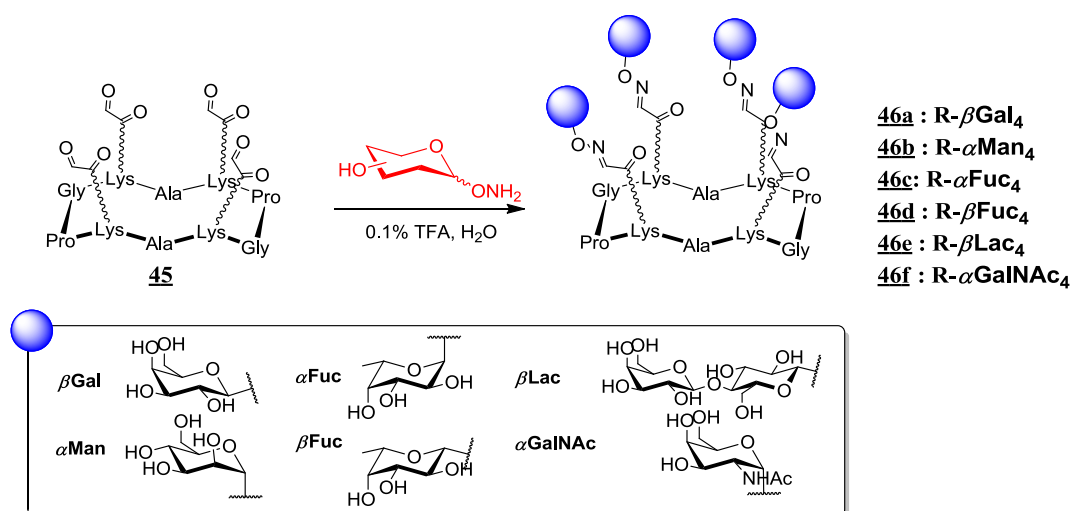


Figure 63. Assemblage des constructions à quatre sucres

Plusieurs conditions opératoires ont été testées pour réaliser la réaction d'oximation. Etant favorisée en milieu acide, nous avons réalisé cette ligation en présence d'acide acétique ou de 0,1% de TFA avec un excès d'oxyamine. Dans les deux cas, cette réaction s'est avérée complète après 4h à 37°C d'après le suivi par HPLC (Figure 64).

¹²⁷ K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138-146.

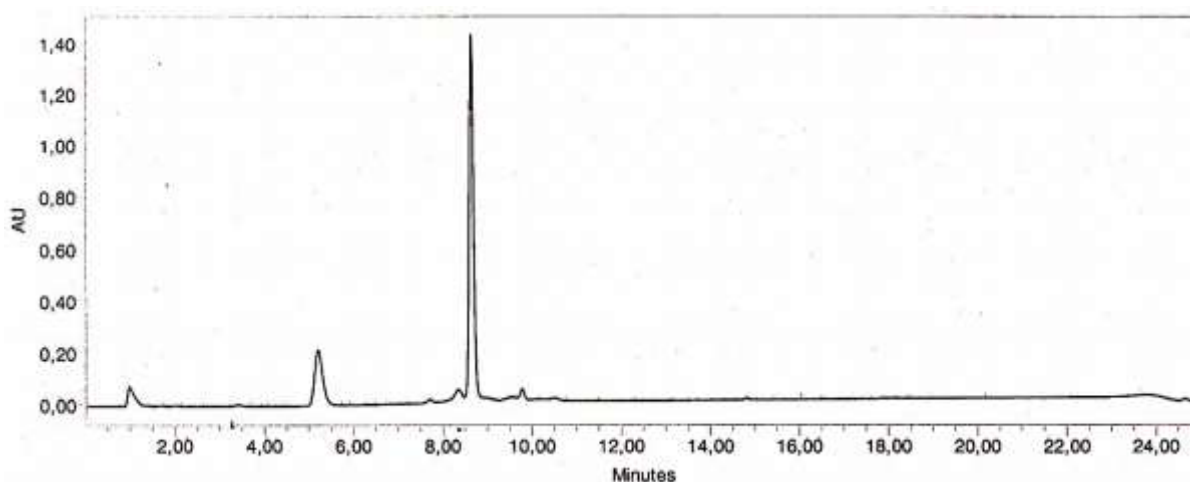
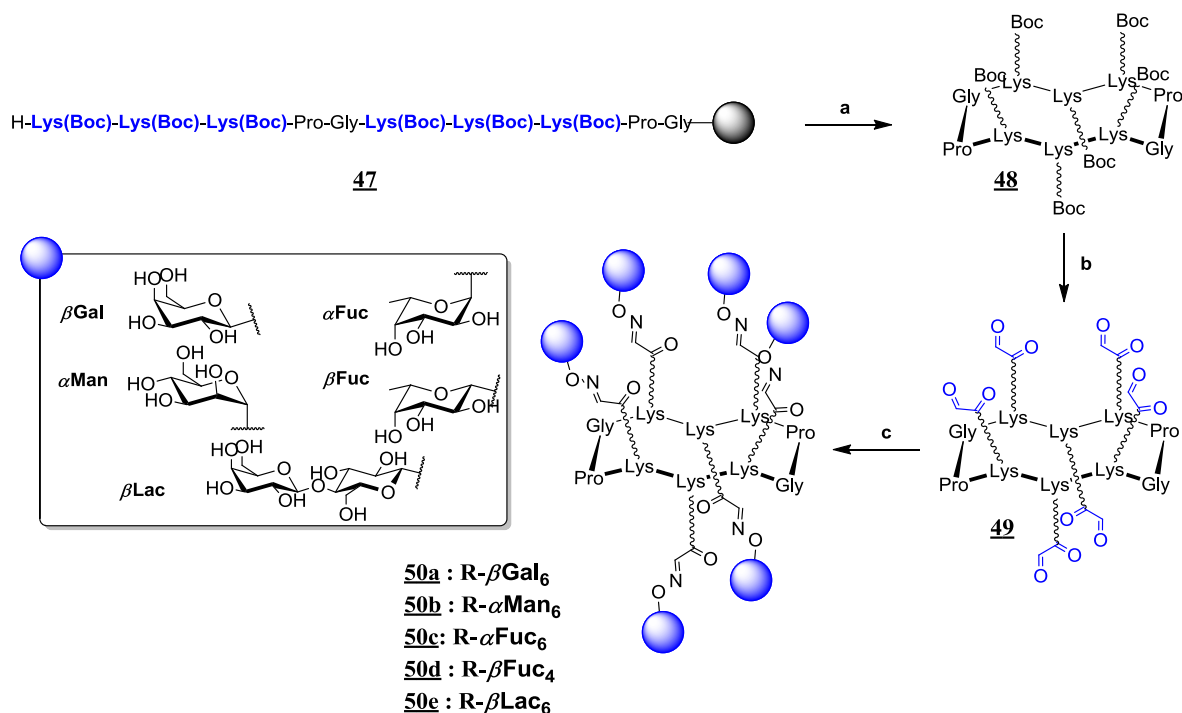


Figure 64. Suivi par HPLC du couplage $R4CHO-TnaONH_2$

En revanche, en présence d'acide acétique, nous avons constaté la formation d'esters hydroxamiques alors qu'aucune réaction secondaire n'a été observée avec le TFA. Le composé est ensuite directement purifié par HPLC semi-préparative pour éliminer l'excès d'oxyamine. Les glycoconjugués tétravalents fonctionnalisés par β -Gal **46a**, α -Man **46b**, α -Fuc **46c**, β -Fuc **46d**, β -Lac **46e** et α -GalNAc **46f** sont obtenus avec des rendements compris entre 53% et 87% et peuvent être utilisés directement pour les études biologiques.

c. Synthèse de glyoclusters hexavalents

Afin d'augmenter le nombre de copies présentées sur le cyclopeptide, les deux alanines sont remplacés par deux lysines. Les chaînes latérales de celles-ci seront orientées dans le domaine inférieur. Ce type de châssis permettra de présenter six résidus saccharidiques de part et d'autre du cycle peptidique (Figure 65).



Réactifs: a. i) 1% TFA , ii) PyBOP, DIPEA,DMF b. i) 50% TFA, ii) BocSer(*t*-Bu)OH, PyBOP, DIPEA, DMF, iii) 50% TFA, iv) NaIO₄, H₂O, rt, 30 min c. 0.1% TFA, H₂O, 37°C.

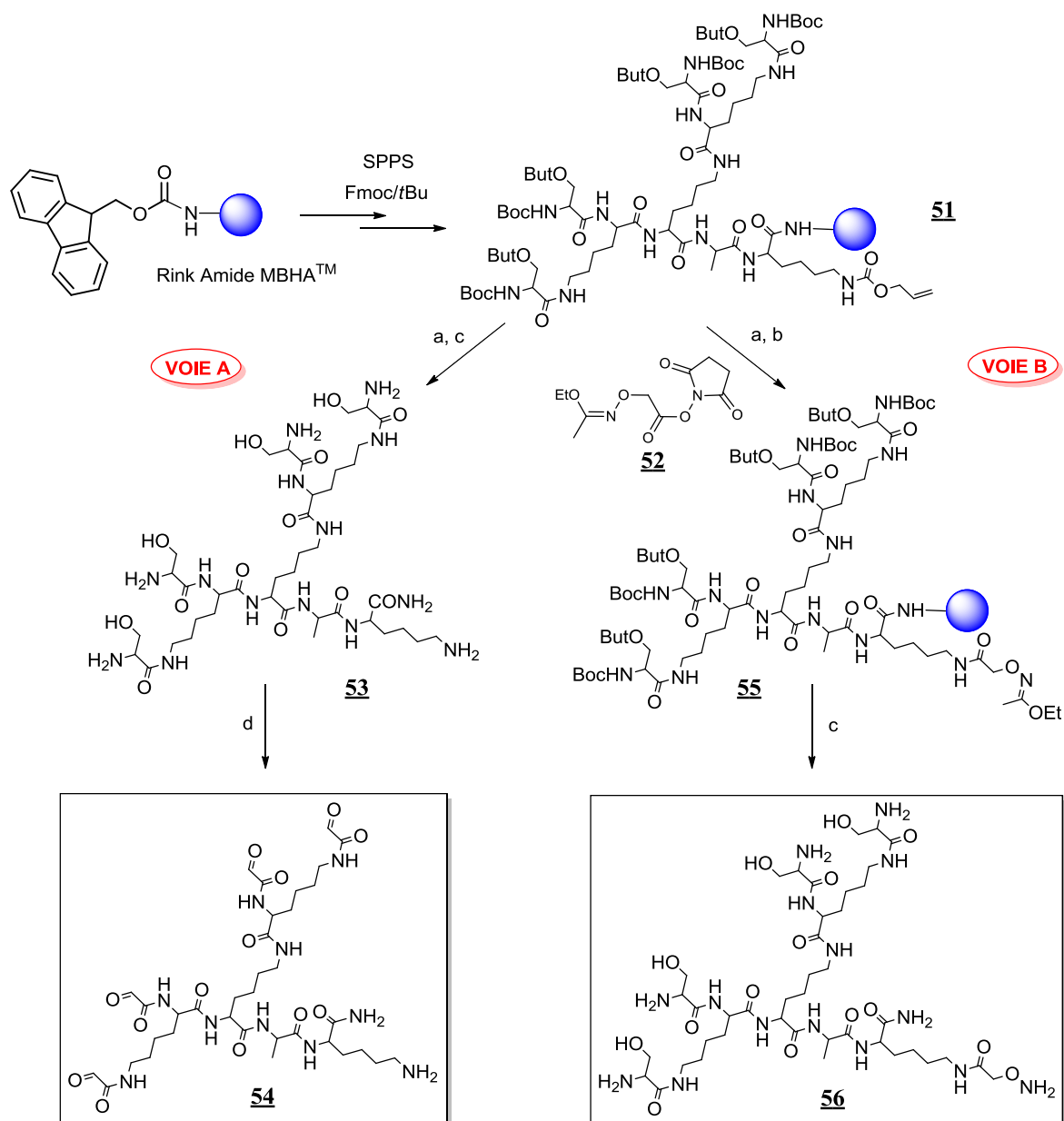
Figure 65. Schéma de synthèse des glycoclusters hexavalents

Le peptide linéaire **47** est élongé par SPPS selon les mêmes conditions que pour le composé tétravalent. Le peptide cyclique **48** comportant six lysines est fonctionnalisé par des résidus sérines et oxydés (composé **49**) selon la méthode de synthèse utilisée précédemment. Finalement, après ligation oxime avec les résidus oxyamines β -Gal **50a**, α -Man **50b**, α -Fuc **50c**, β -Fuc **50d**, β -Lac **50e**, nous obtenons cinq glycoconjugués hexavalents obtenus avec de bons rendements allant de 65% à 80%.

II.3.2. Assemblage de glycoclusters par une stratégie d'assemblage par « double oxime »

Nous avons envisagé une autre manière d'augmenter le degré de multivalence de nos systèmes en introduisant sur un même RAFT des structures multivalentes telles que des polylysines ou un second RAFT. Une telle approche nécessite de synthétiser une structure polylysine exhibant des sérines en bout de chaîne et un bras oxyamine à la seconde extrémité. La synthèse de cette structure polybranchée est une synthèse classique par SPPS sur Rink Amide qui permet une coupure et une déprotection des groupements acido-labiles simultanément.

a. Synthèse des dendrimères de lysines modifiés



Réactifs: a. Pd(PPh₃)₄, PhSiCl, CH₂Cl₂, Ar, 30 min
 b. **52**, DIEA, DMF c. TFA/TIS/NH₂OH-HCl, 2h d. NaIO₄, 30 min, H₂O

Figure 66. Synthèse des polypeptides **54** et **55**

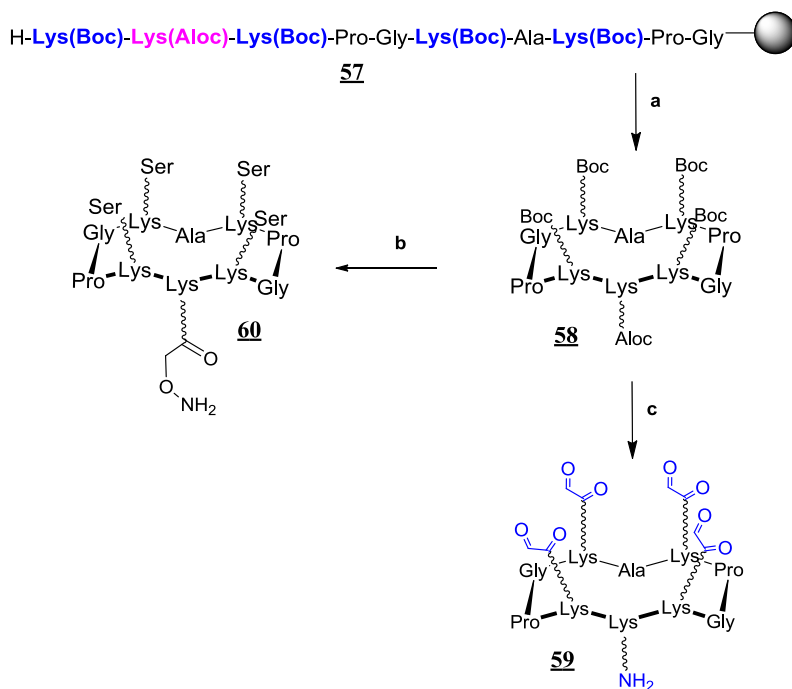
La séquence peptidique commence par une lysine protégée orthogonalement sur sa chaîne latérale par un groupement Alloc afin de pouvoir introduire un bras oxyamine¹²⁸ (Figure 66). Le troisième acide aminé est une lysine de type FmocLys(Fmoc)-OH qui permet par une double fonctionnalisation d'introduire deux autres lysines de même nature. Finalement, quatre sérines protégées par des groupements Boc et tert-Butyl sont couplées en fin de séquence.

¹²⁸ V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, 63, 11952-11958.

Après l'élongation du peptide **51**, le groupement Alloc est éliminé en présence d'un catalyseur Pd(PPh₃)₄ et de phénylsilane sous atmosphère inerte. A ce stade, le peptide est coupé du support et directement oxydé par un excès de périodate de sodium. Le peptide **54** est directement purifié par HPLC semi-préparative et obtenu avec un rendement global de 70% (Voie A). Le composé **51** a été fonctionnalisé sur la chaîne latérale de la lysine en N-term par un bras espaceur oxyamine **52** (Voie B). Ce groupement a été introduit en utilisant l'ester activé **52** protégé par un groupement 1-éthoxy-éthylidène pour conduire à l'intermédiaire **55**. L'efficacité de la ligation du couplage sur la lysine est contrôlée par test TNBS. La coupure du peptide et la déprotection simultanée des groupements protecteurs Boc et tert-butyles sont réalisées en milieu fortement acide (95% de TFA) en présence d'une solution aqueuse d'hydroxylamine et de triisopropylsilane afin de piéger les carbocations libérés. L'utilisation de la solution d'oxyamine libre comme piègeurs de carbocations usuels s'est avérée afin de prévenir la N-alkylation éventuelle de l'oxyamine qui pourrait survenir pendant la coupure du peptide de son support. Le polypeptide **56** est obtenu sous forme d'une poudre blanche après purification par HPLC semi-préparative avec un rendement global de 63%. Les analyses par ESI-MS confirment la masse du produit attendu et ne montre pas de pic pouvant correspondre à des produits secondaires.

b. Synthèse de châssis moléculaires à deux domaines

La synthèse du RAFT nécessaire à l'assemblage de structures à haute valence est réalisée selon la même méthode de synthèse que dans le cas du châssis moléculaire **45**.



Réactifs: a. i) 1% TFA, ii) PyBOP, DIPEA, DMF b. i) 50% TFA ii) BocSertBuOH, PyBOP, DIPEA, DMF iii) Pd(PPh₃)₄, PhSiCl, CH₂Cl₂, Ar, 30 min iv) **52**, DIPEA, DMF v. 50% TFA c. i) 50% TFA ii) BocSertBuOH, PyBOP, DIPEA, DMF iii) Pd(PPh₃)₄, PhSiCl, CH₂Cl₂, Ar, 30 min iv) NaIO₄, 30 min, H₂O

Figure 67. Synthèse du RAFT comportant une fonction oxyamine

La séquence ici comporte quatre lysines protégées par un groupement Boc et une lysine protégée par un groupement orthogonal Aloc afin de pouvoir fonctionnaliser régiosélectivement les deux domaines du cyclopeptide (composé **57**) (Figure 67). Après cyclisation (**58**), les chaînes latérales de lysines sont déprotégées par une solution acide diluée puis les sérines sont adressées en présence de PyBOP et de DIPEA. La déprotection du groupement Aloc dans les conditions précédentes est effectuée. Elle est suivie soit par l'introduction de la fonction oxyamine protégée par un groupement 1-éthoxyéthylidène par lien amide soit par l'oxydation directe des sérines pour conduire au composé **59**. Le châssis moléculaire **60** est obtenu après libération en présence d'une solution acide diluée des fonctions aminoalcools et oxyamine.

c. Synthèse des glycoclusters hexadécavalents par assemblage itératif

➤ Châssis moléculaires à cœur RAFT :

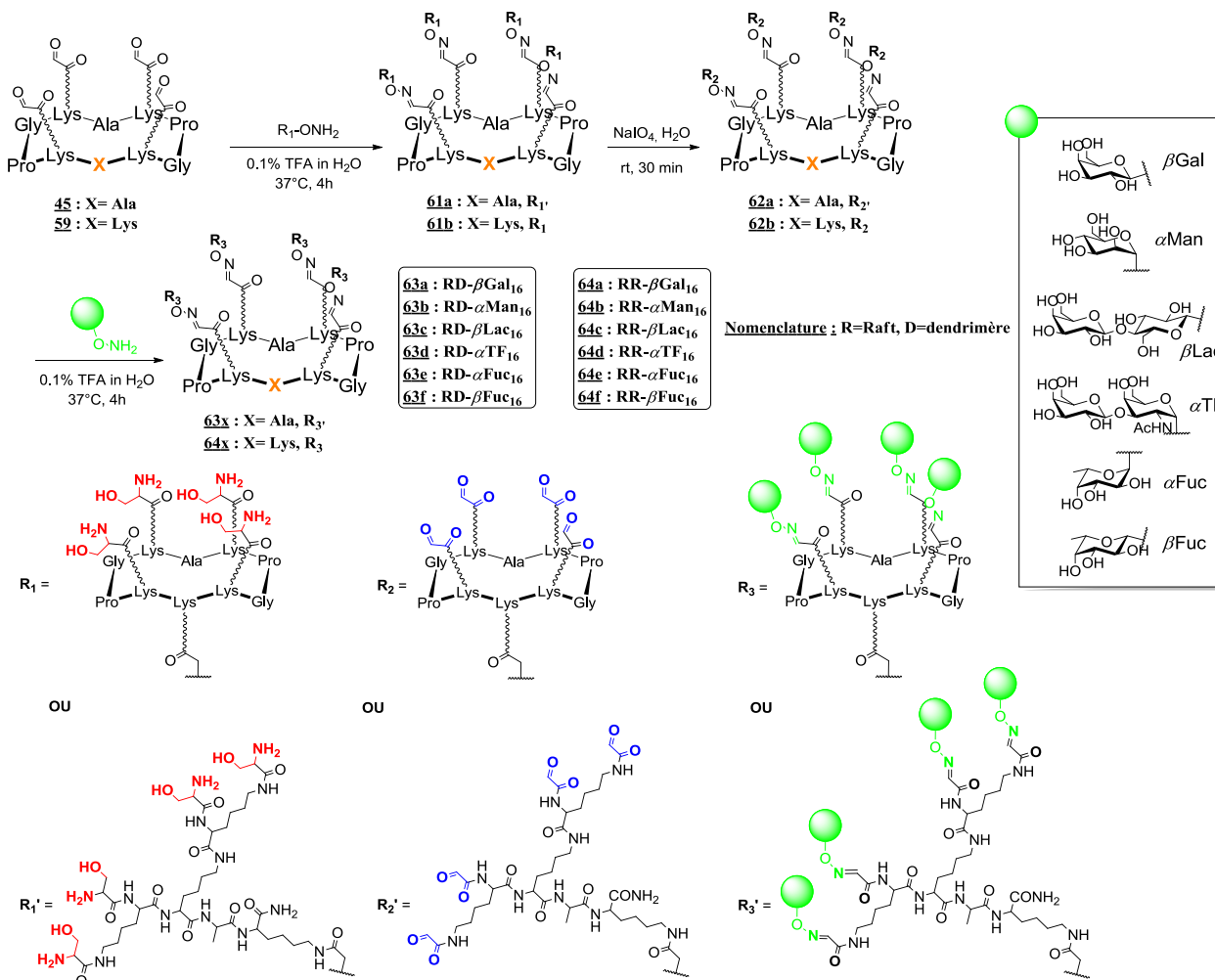


Figure 68. Synthèse des composés hexadécavalents des séries **63** et **64**

La nomenclature suivante sera utilisée tout au long de ce manuscrit. R signifie RAFT et D signifie dendrimer polylysine. La série DD décrit une molécule avec un cœur polylysine fonctionnalisée par quatre dendrimères polylysines. La série RR décrit une molécule ayant un cœur RAFT fonctionnalisée par quatre RAFT. La série RD décrit une molécule ayant un cœur RAFT fonctionnalisée par quatre dendrimères polylysines. Enfin la série DR décrit une molécule avec un cœur dendrimerique fonctionnalisé par quatre RAFT. A partir du cyclodécapeptide tétraaldéhydiques **45** ou **59**, le ligand **R₁** (**56** ou **60**) est introduit par ligation oxime conduisant aux conjugués **61a** ou **61b** (Figure 68). L'excès de composé **R₁** est neutralisé par introduction d'une quantité équimolaire d'acétone pour pouvoir réaliser l'oxydation sans purification préalable et éviter des oximations parasites dues à la présence de

l'excès de composés oxyaminés n'ayant pas réagi. La coupure oxydative des fonctions aminoalcools par le périodate de sodium conduit aux produits **62a** ou **62b** contenant seize fonctions aldéhydes directement purifiés par HPLC semi-préparative avec des rendements respectifs de 92% et 95%. Comme pour les composés tétravalents **46**, le châssis moléculaire est décoré de différents motifs saccharidiques introduits en excès dans les mêmes conditions opératoires que précédemment. L'excès de sucres oxyamines est éliminé par HPLC semi-préparative et les composés formés sont obtenus sous forme de lyophilisats blancs avec de bons rendements. Par cette méthode itérative comprenant des étapes successives d'oxydation et d'oximation, nous avons donc accès à une série de douze glycoclusters hexadécavalents (série **63** ou **64**) variant par leur architecture.

➤ *Châssis moléculaires à cœur polylysines :*

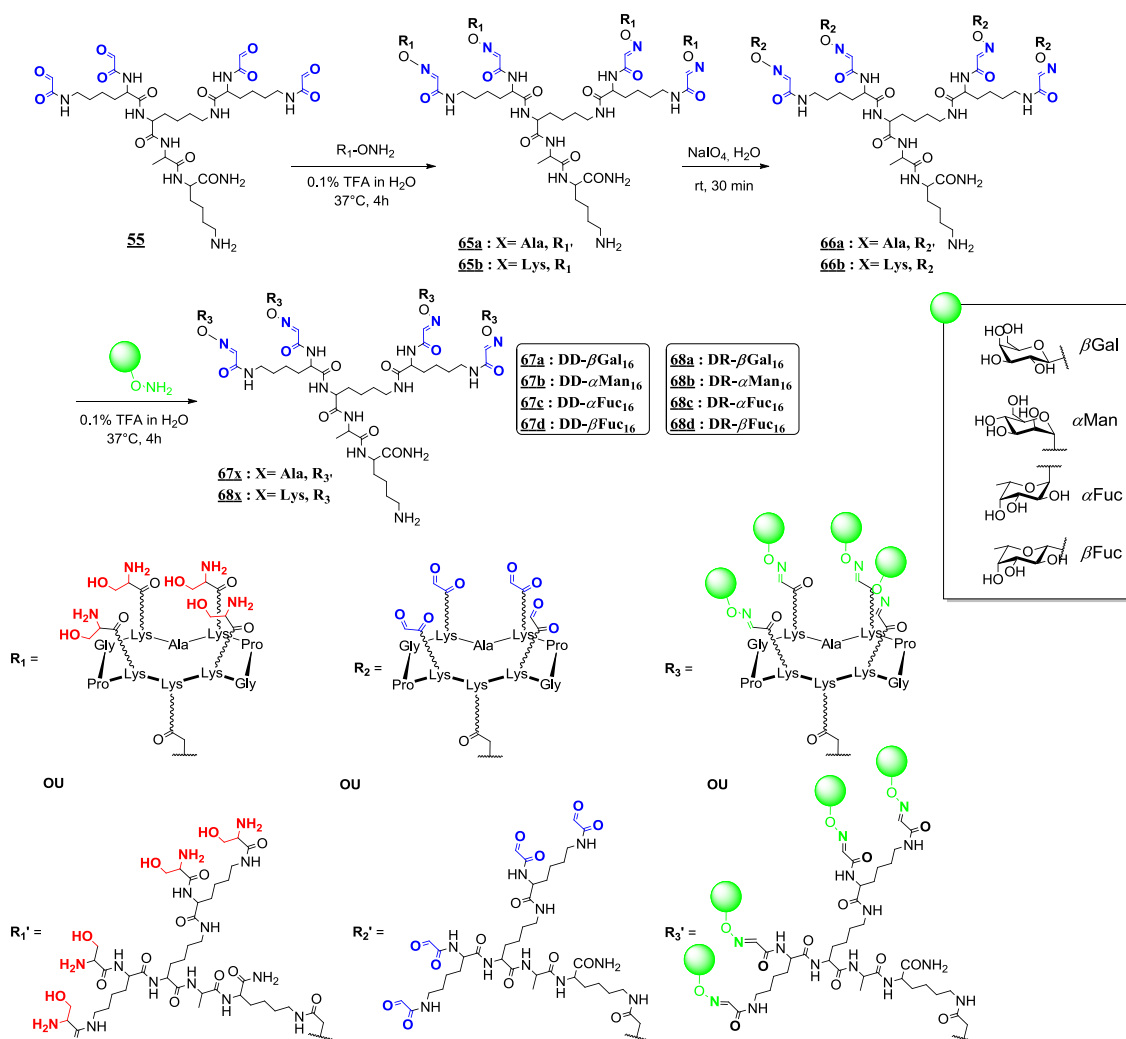


Figure 69. Schéma de synthèse des glycoconjugués à cœur polylysines

Nous avons synthétisé des structures possédant un cœur différent en suivant une stratégie similaire décrite précédemment. Ceci nous permettra d'étudier l'influence de l'architecture des ligands pour diverses applications biologiques comme nous le verrons dans le chapitre 2. A partir du cœur polypeptidique **55**, les ligands **R₁** (**56** ou **60**) sont introduits *via* un lien oxime selon la stratégie itérative précédente qui conduit à la formation des glycoclusters hexadécavalents (série **67** ou **68**) (Figure 69).

II.3.3. Synthèse de glycoconjugués polyfonctionnels

a. Stratégie de synthèse

Dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'équipe du Pr V. Kren, nous avons envisagé d'introduire des peptides et des sucres sur les deux faces du RAFT par une stratégie itérative similaire à celle décrite précédemment. L'objectif était de synthétiser des molécules possédant quatre motifs sucres dans le domaine de reconnaissance et de peptides dans le domaine effecteur et inversement. Pour réaliser ces assemblages originaux, nous utiliserons des châssis moléculaires fonctionnalisés par des bras oxyamines et des sérines. La séquence peptidique sera quant à elle fonctionnalisée par son extrémité *N*-terminale par un résidu sérine.

➤ Synthèse des ligands peptidiques

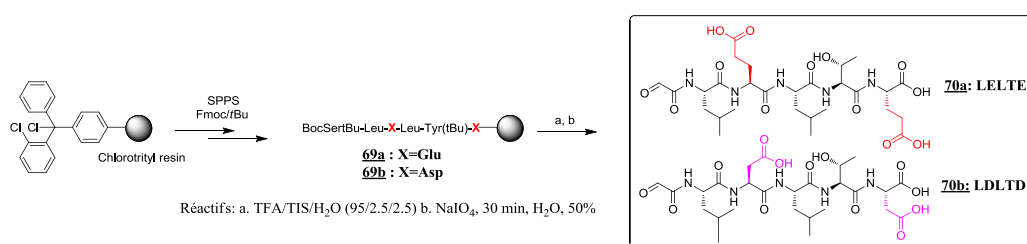
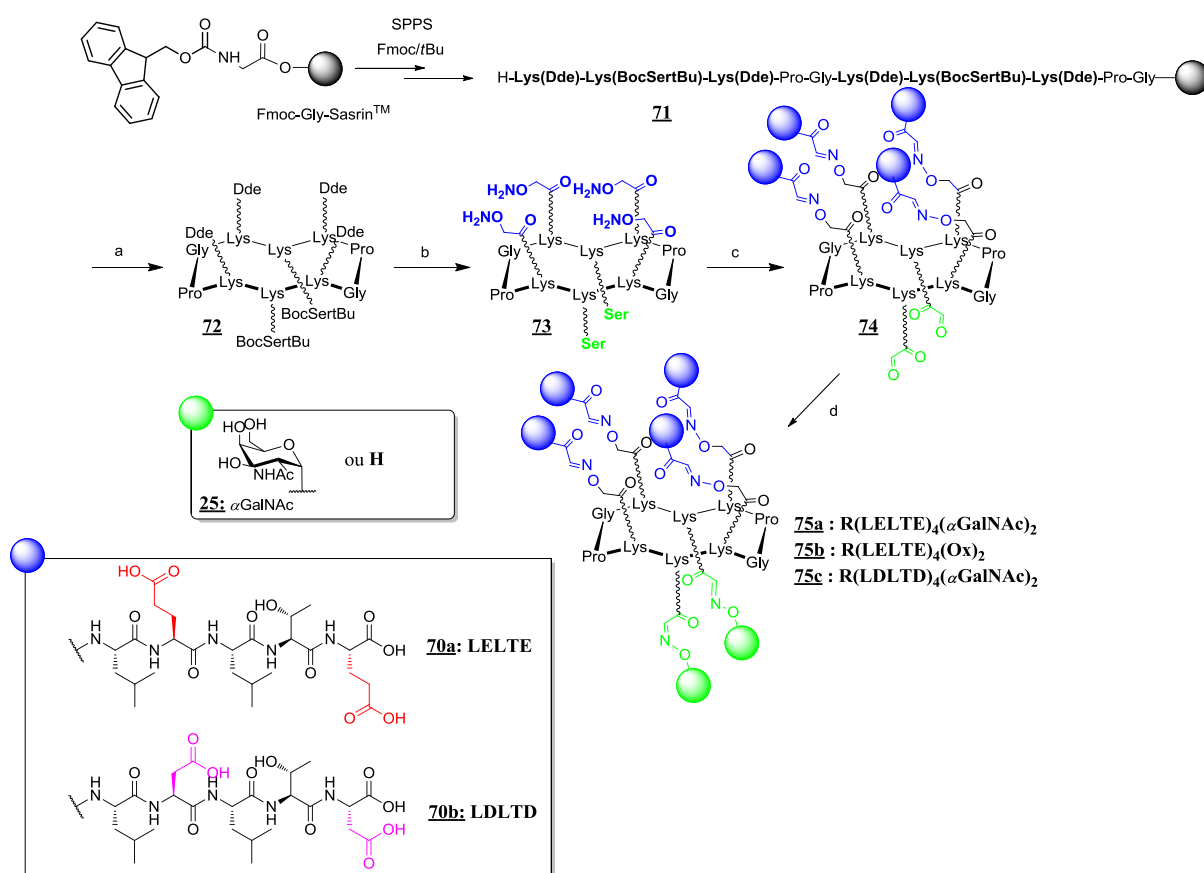


Figure 70. Synthèse des ligands peptidiques **70a** et **70b**

Les peptides sont synthétisés par la méthode SPPS sur une résine Chlorotriptyl. La séquence contient en positions 1 et 3 un acide aspartique ou glutamique (Figure 70). Le peptide est décroché et totalement déprotégé en présence d'une solution de TFA/TIS/H₂O et la fonction aminoalcool est oxydée par le périodate de sodium. Les peptides **70a** et **70b**, obtenus après purification avec des bons rendements, seront introduits par ligation oxime sur deux types de châssis moléculaires.

➤ Synthèse des châssis moléculaires



Réactifs: a. i) 1% TFA, ii) PyBOP, DIPEA, DMF b. i) 1% NH₂NH₂, DMF ii) peptide-CHO, DIPEA, DMF
 iii) 50% TFA, DCM c. i) **70a** ou **70b**, 0.1% TFA, 37°C ii) NaIO₄, H₂O, 30 min d. GalNAcONH₂ **25** ou hydroxylamine, 0.1% TFA, 37%

Figure 71. Synthèse de glycopeptides polyfonctionnels

Pour réaliser un assemblage régiosélectif sur la plateforme, nous avons utilisé des groupements protecteurs orthogonaux Dde ainsi que des lysines pré-fonctionnalisées sur leur chaîne latérale FmocLys(BocSert-Bu)OH (peptide **71**)¹²⁹.

Un premier cyclodécapeptide **72** comportant 4 groupements Dde sur la face supérieure et deux sérines sur la face inférieure a été synthétisé (Figure 71). Les groupements Dde ont été déprotégés en présence d'hydrazine puis les fonctions oxyamines protégées ont été introduites. Après déprotection simultanée des sérines et des fonctions oxyamines en milieu acide (composé **73**), les ligands peptidiques **70a** ou **70b** sont introduits sur le produit **73** par ligation oxime. Les sérines sont finalement oxydées pour permettre l'introduction des

¹²⁹ S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.

oligosaccharides oxyamine **25** ou d'hydroxylamine commerciale pour conduire aux composés **75a** et **75b**.

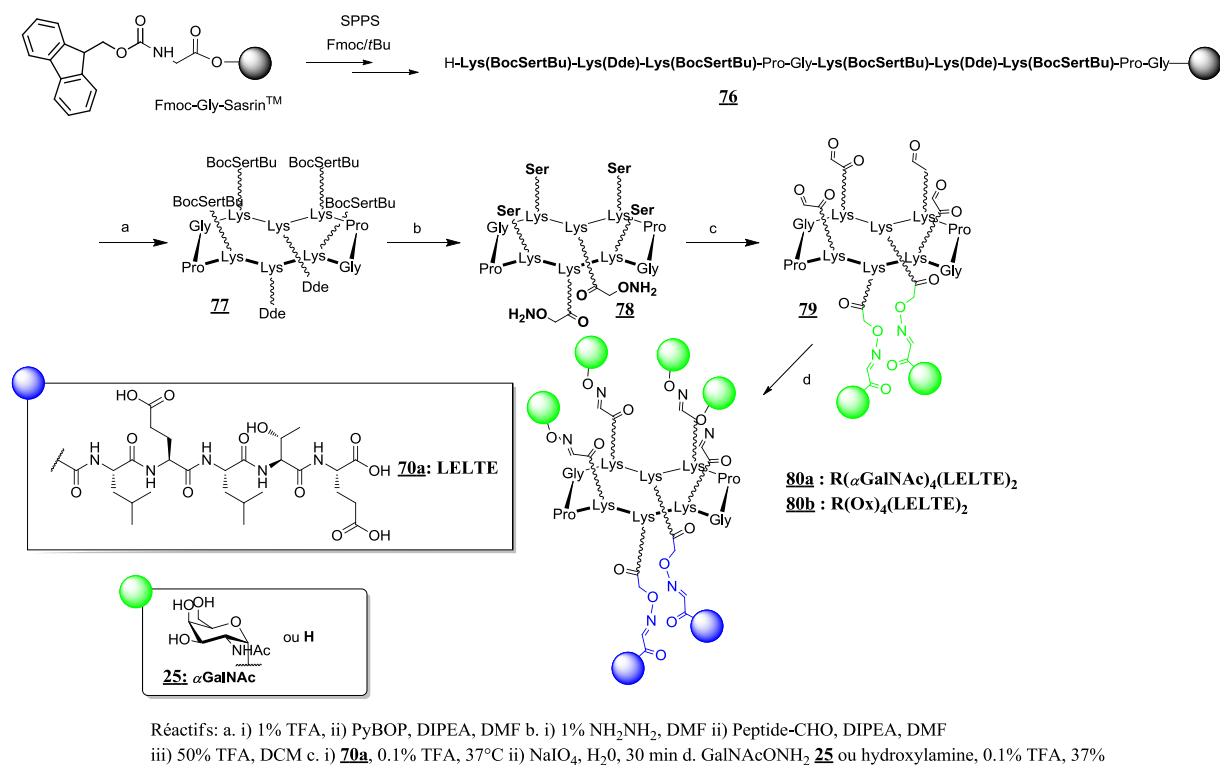


Figure 72. Glycocluster présentant un fort potentiel activateur

Une stratégie similaire a été utilisée pour synthétiser un second cyclodécapeptide **78** comportant 4 sérines sur la face supérieure et deux oxyamines sur la face inférieure a été synthétisé (Figure 72). L'assemblage final sur les deux faces s'est déroulé sans difficulté notable pour conduire aux composés **80a** et **80b**.

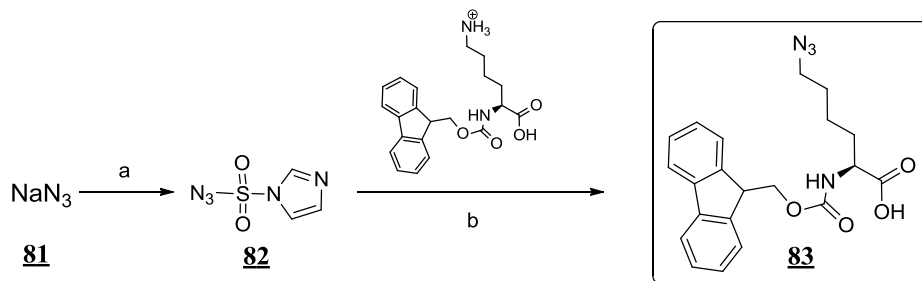
Pour conclure, les différentes stratégies de synthèse utilisant la réaction d'oximation se sont montrées très efficaces pour obtenir des structures à haut degré de glycosylation et polyfonctionnels. Nous avons toutefois, étudié un autre type de ligation pour améliorer la modularité ou apporter une alternative à notre stratégie d'assemblage.

II.3.4. Assemblage de glycoclusters par ligation CuAAC

La ligation CuAAC est très largement étudiée depuis quelques années. Elle a été utilisée au sein du laboratoire récemment pour l'assemblage de diverses biomolécules mais n'avait jamais été exploré pour la ligation de saccharides. Pour cette ligation, nous avons choisi d'introduire les fonctions azotures au niveau du RAFT sur les chaînes latérales de lysines.

Ceci est réalisé un diazotransfert pour obtenir l'azidonorleucine et l'incorporer directement par SPPS.

a. Synthèse de l'azidonorleucine



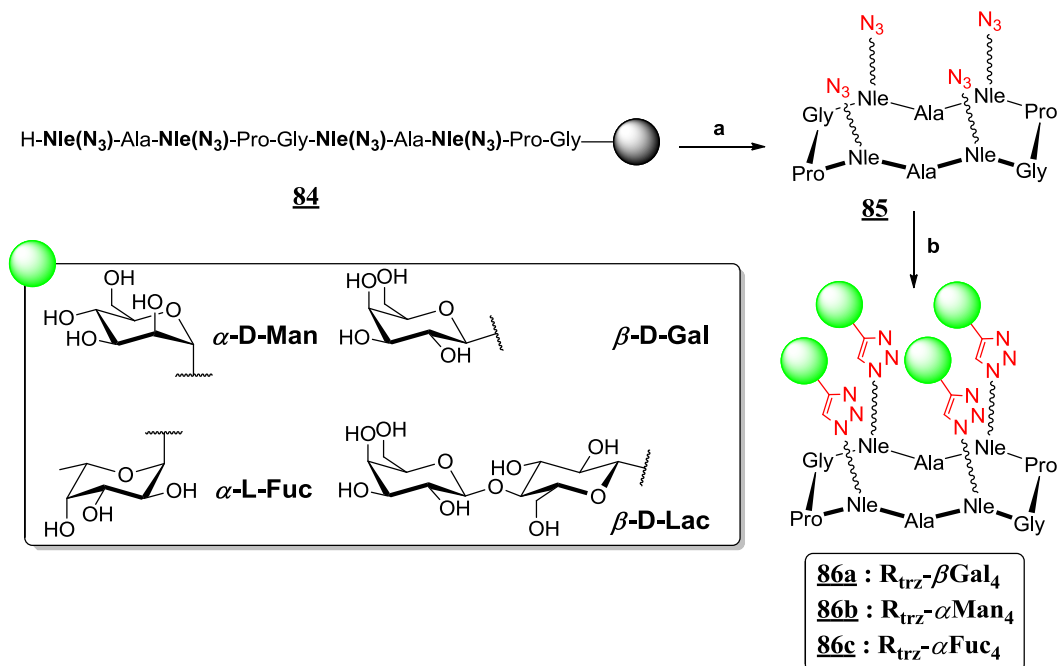
Réactifs: a. i) SO_2Cl_2 , MeCN ii) imidazole b. ZnCl_2 , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, TEA

Figure 73. Synthèse de l'azidonorleucine

Le groupement imidazolate **82** permet de préparer l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle à partir de l'azoture de sodium **81** pour accéder à un donneur d'azoture efficace¹³⁰ (Figure 73). Nous réalisons ensuite le transfert d'azoture en conditions basiques en présence d'une quantité catalytique de chlorure de zinc conduisant à la Fmoc-Nle(N₃)-OH **83** avec un rendement global de 91%. Cet acide aminé modifié est ensuite introduit dans la synthèse par SPPS des châssis moléculaires puisqu'il est stable dans les conditions de synthèse peptidique (milieu basique et acide dilué). Une seconde stratégie aurait pu être de réaliser le diazotransfert directement sur phase solide mais il est moins aisé à réaliser et nécessite un temps de réaction beaucoup plus long qu'en solution. Nous avons essayé de réaliser cette réaction sur support solide. Malheureusement, alors que l'introduction d'un seul groupement azoture ne présente pas de difficultés, le diazotransfert sur quatre résidus lysines est beaucoup plus problématique et ne conduit pas au produit attendu.

¹³⁰ E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800.

b. Synthèse et assemblage de glycoclusters par méthode CuAAC



Réactifs: a. i) 1% TFA, ii) PyBOP, DIPEA, DMF b. **38-41**, Cu(0) 0.4eq., Tp
AcONH₄ pH 7.3, *t*-BuOH, 71-75%

Figure 74. Synthèse de la famille de glycoconjugués **86**

Selon la stratégie de synthèse mise en place pour le composé tétraaldéhyde **45**, le peptide linéaire contenant quatre azidonorleucines **84** est synthétisé par méthode SPPS. Après coupure et cyclisation, nous obtenons le composé **85** comportant quatre sites d'ancrage pour le couplage par méthode CuAAC (Figure 74). Les ligands saccharidiques alcynes **38** à **41** sont incorporés en présence de cuivre Cu(0) dans un milieu tamponné pH 7.3. Ce couplage est suivi par HPLC analytique qui nous montre la formation d'un produit unique en 2h. Quatre nouveaux glycoclusters (série **86**) ont pu être obtenus avec des rendements allant de 71 à 75%. Cette méthode de ligation a également pu être employée pour la synthèse d'hétéroglycoclusters tétravalents décorés par deux ligands saccharidiques différents (Figure 75).

c. Assemblage d'hétéroglycoclusters par lien oxime et méthode CuAAC

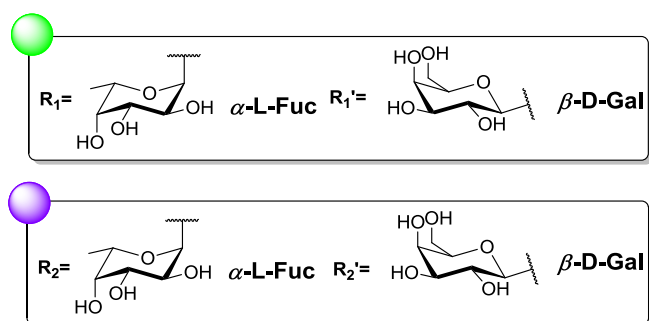
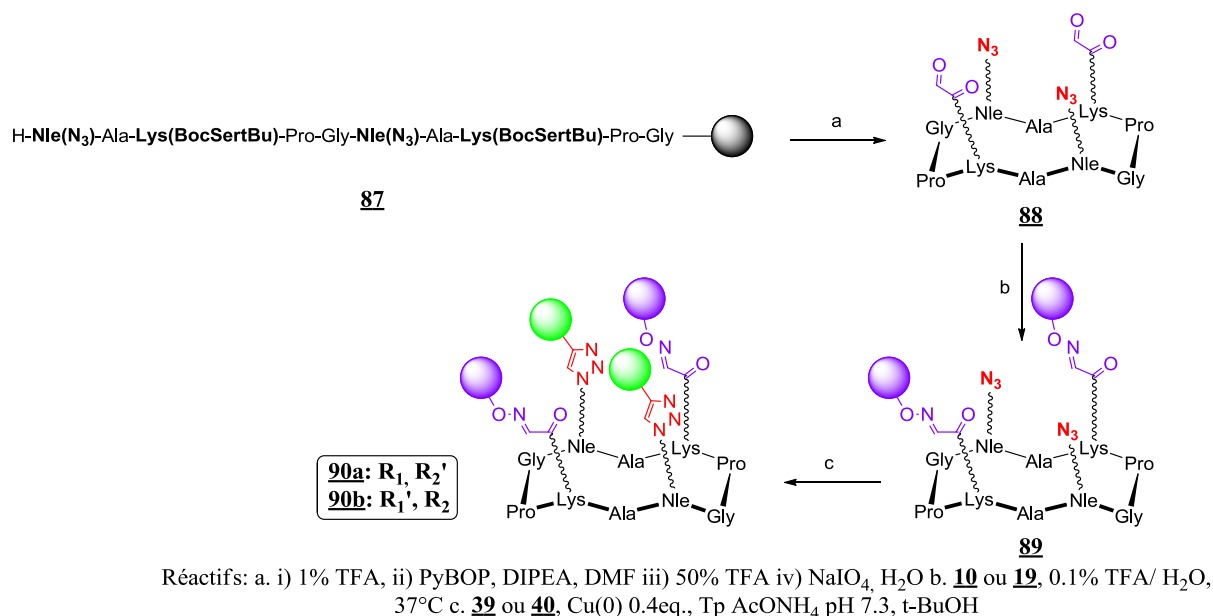


Figure 75. Schéma de synthèse d'un hétéroglycocluster **90**

Ce châssis moléculaire peut être obtenu facilement en incorporant les fonctions chimiques complémentaires à celles des dérivés osidiques aux positions appropriées de la séquence peptidique linéaire (Figure 75). Le peptide **88** comportant deux fonctions aldéhydes aux positions 3 et 8 et deux fonctions azotures aux positions 5 et 10 est préparé à l'aide des acides aminés modifiés. Le sucre oxyamine est couplé sur le composé **89** en milieu acide dilué en une heure à 37 °C. Après lyophilisation de la solution le composé **89** est dissous en milieu tamponné à pH 7.3. Le sucre alcyne est introduit dans les mêmes conditions que précédemment et après purification l'hétéroglycocluster **90a** ou **90b** est obtenu avec un rendement de 75% pour ces deux étapes d'assemblages.

II.3.5. Caractérisation des glycoclusters

Même si les stratégies de synthèse sont extrêmement efficaces et conduisent facilement aux produits attendus, leur caractérisation est particulièrement difficile et fastidieuse en raison de leur taille et de leur nature.

- ✓ *Caractérisation des molécules par RMN et par spectrométrie de masse ESI-MS et MALDI-TOF*

Les peptides sont généralement caractérisés en routine par spectrométrie de masse (=SM) (ionisation par électrospray ou MALDI-TOF suivant le poids moléculaire), plus rarement par spectroscopie RMN en raison du nombre important de protons. Concernant nos composés, l'analyse par SM est délicate à partir de l'étape d'oxydation des sérines en raison de l'absence fréquente de résidus facilement ionisables. La RMN nous apporte alors des informations essentielles sur la structure exacte de nos composés.

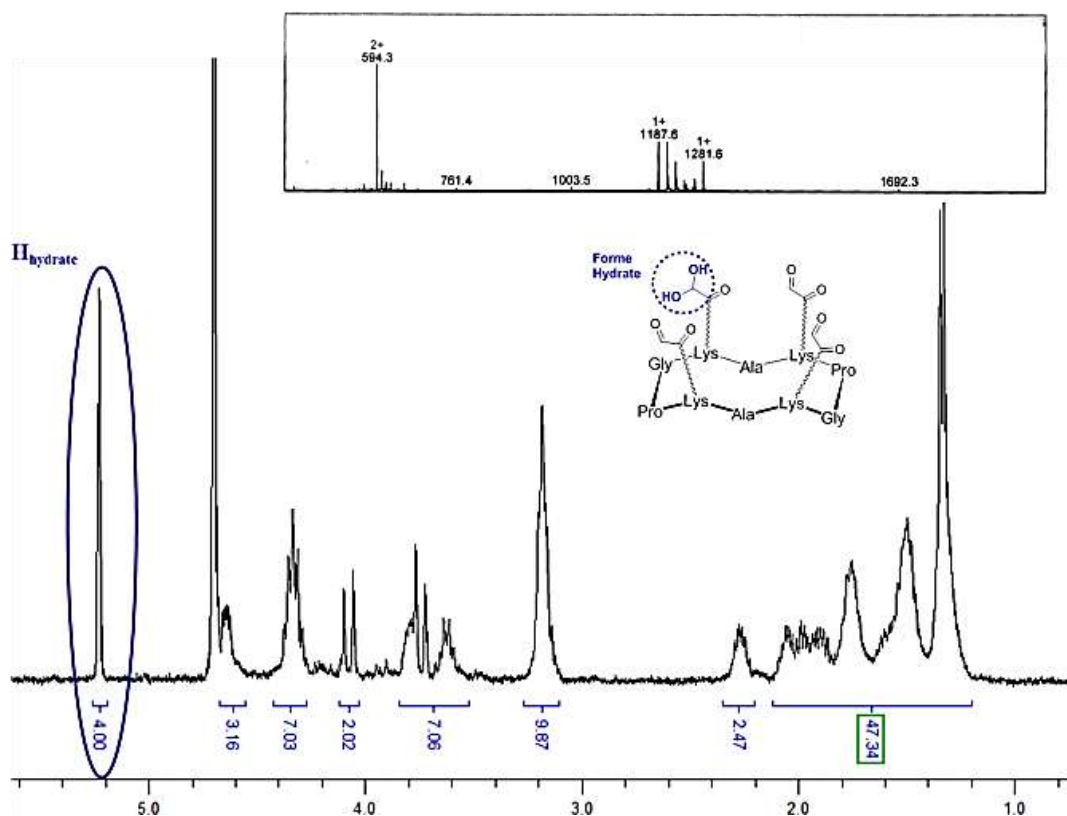


Figure 76. Caractérisation de la molécule tétravalente aldéhyde **45**

Comme le montre le spectre RMN ¹H du composé **45** dans D₂O, un singulet à 5.22 ppm intégrant pour 4 protons (Figure 76) indique que la fonction aldéhyde est présente sous forme hydrate comme unique espèce moléculaire. Cependant, le spectre ESI-MS montre la présence

de l'adduit monochargé à 1187.6, mais également d'autres adduits correspondant à des formes partiellement hydratées et salines de la molécule (adduit avec du sodium ou potassium le plus souvent).

Dans le cas de la structure hexadécavalente, les fonctions aldéhydes hydratées sont présentes sous forme de deux singulets intégrant pour seize protons confirmant ainsi l'efficacité de la réaction d'oxydation (Figure 77). Comme pour le composé tétravalent, les adduits monochargés observés par spectrométrie de masse correspondent aux formes partiellement hydratées du composé.

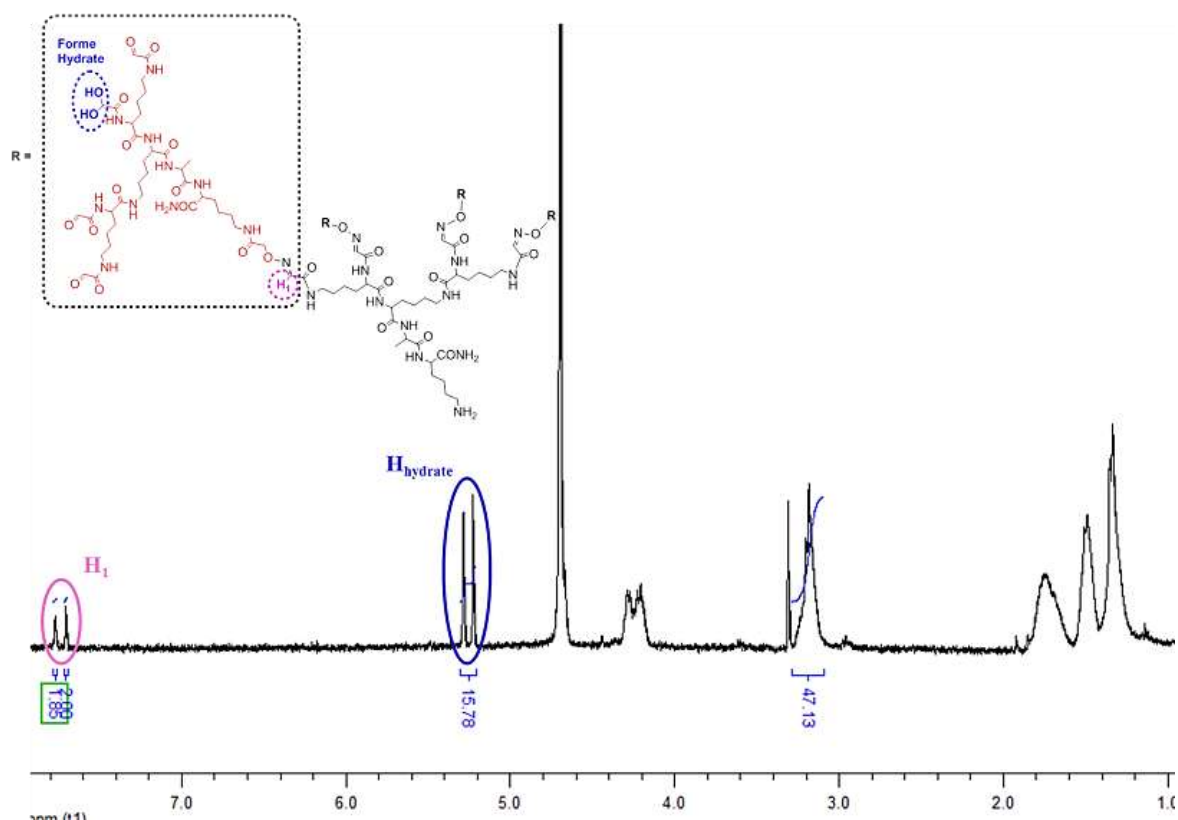


Figure 77. Caractérisation du composé hexadécaaldéhyde **66a**

Après ligation des dérivés saccharidiques, nous avons eu des difficultés similaires pour caractériser les glycoconjugués par SM et confirmer le nombre de sucres introduit. D'une part, lorsque les sucres sont couplés par oximation, un spectre de masse souvent complexe est obtenu à cause de la fragmentation du lien oxime. Dans le cas des molécules tétravalentes et hexavalentes, la SM et la RMN nous permettent de caractériser complètement nos conjugués.

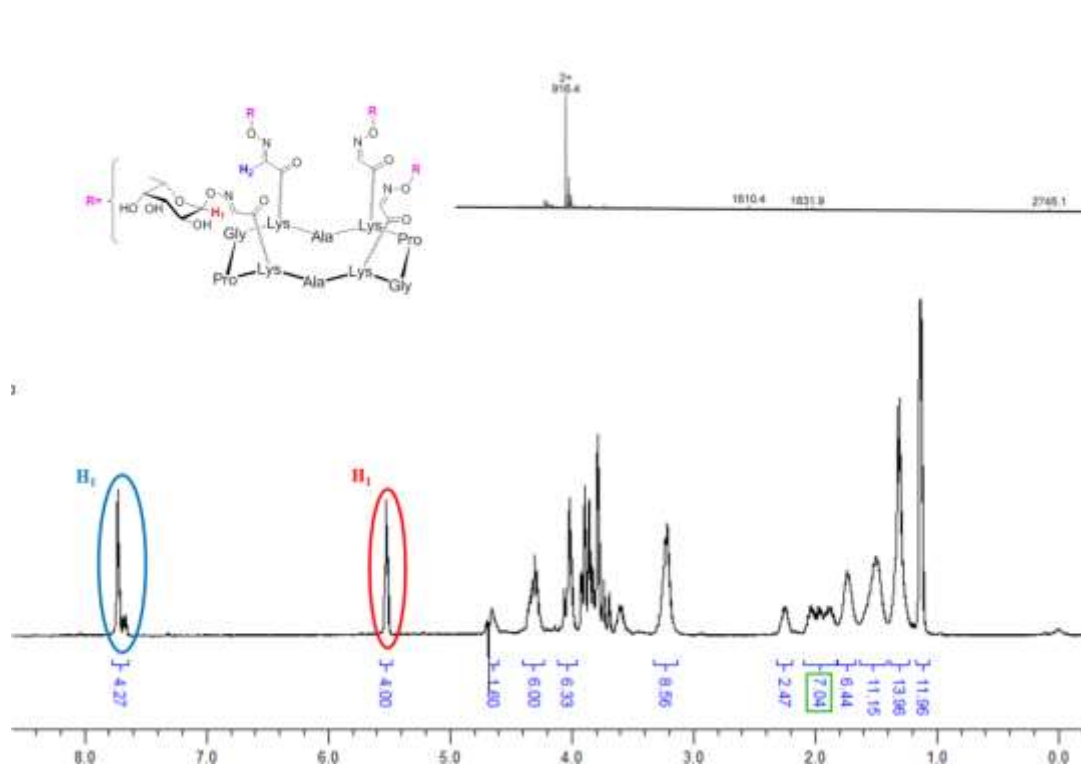


Figure 78. Spectre RMN ^1H correspondant à la molécule $R\text{-}\alpha\text{Fuc}_4$

La présence des sucres est facilement identifiée par l'apparition de nouveaux signaux caractéristiques sur le spectre ^1H (Figure 78). La disparition du singulet correspondant à la forme hydrate des aldéhydes à 5.22 ppm est à noter. Un singulet présent à 5.5 ppm intégrant pour quatre protons correspond aux protons H-1 des sucres. Le signal présent à 7.8 ppm intégrant également pour quatre protons correspond aux protons des liens oximes formés. Ces signaux confirment de quatre unités sucres sur la plateforme peptidique. L'attribution complète du spectre est possible à partir des spectres COSY, TOCSY et NOESY (voir partie expérimentale).

Dans le cas des molécules hexadécavalentes, la caractérisation est beaucoup plus complexe. La spectrométrie de masse par ESI-MS ne nous a pas permis de caractériser nos constructions glycosylées. Cette technique n'est pas la mieux adaptée à nos glycoconstructions de hauts poids moléculaire à cause des adduits formés par la présence de sels et de la fragmentation du lien oxime. Des expériences de RMN bidimensionnelle nous ont cependant apporté une réponse à notre problème de caractérisation.

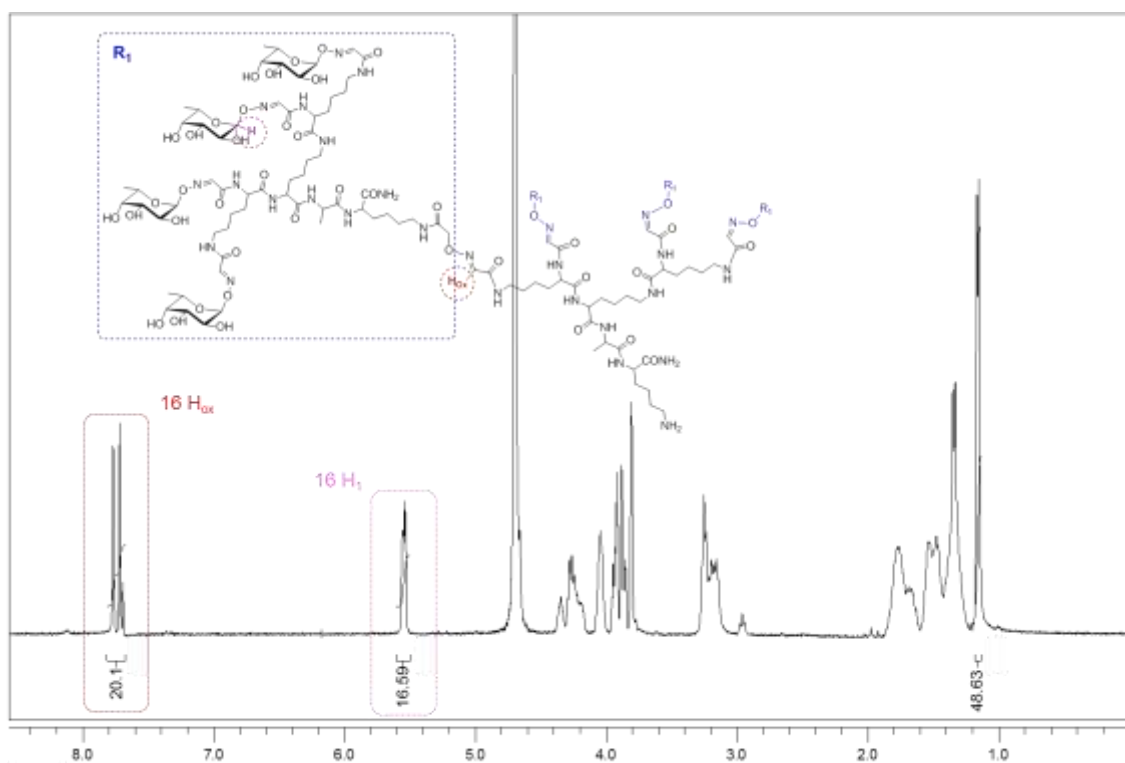


Figure 79. Spectre RMN ^1H du composé DD- αFuc_{16} **67c**

Les données obtenues révèlent une symétrie au sein de la molécule qui organise la molécule en quatre environnements magnétiques identiques. Ainsi, on observe une simplification du spectre RMN ^1H pour toutes nos molécules. Il est également possible d'identifier deux signaux caractéristiques de ces glycoconstructions confirmant leur valence (Figure 79). Le signal présent à 7.8 ppm intégrant pour 20 correspond aux protons des liens oximes (H_{ox}) au sein de la molécule. Le multiplet à 5.6 ppm intégrant pour 16 correspond aux protons anomériques (H-1) des ligands sacchariques liés. L'attribution complète du spectre est rapportée dans la partie expérimentale pour l'ensemble de nos molécules glycosylées. Malgré la simplification du spectre RMN, la largeur des signaux ne permet pas d'identifier des sous-produits partiellement glycosylés éventuellement présents. Il est donc nécessaire de caractériser les glycoconjugués par spectrométrie de masse. Les analyses par MALDI-TOF nous a permis d'obtenir des spectres de masse acceptable (Figure 80). En collaboration avec l'équipe de V. Kren, un protocole de traitement des échantillons a été mis au point pour effectuer ces analyses. En effet, il est connu que les conditions d'analyses et de préparation de l'échantillon sont importantes pour la détection des molécules par cette technique¹³¹. Pour toutes ces composés, les pics moléculaires ont été obtenus en mode linéaire positif mais avec

¹³¹ Y. Mechref, M. V. Novotny, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 321-369.

une fragmentation partielle. Une diminution de l'intensité du laser pour limiter ce phénomène ne nous permet pas d'obtenir un signal suffisant pour les analyses.

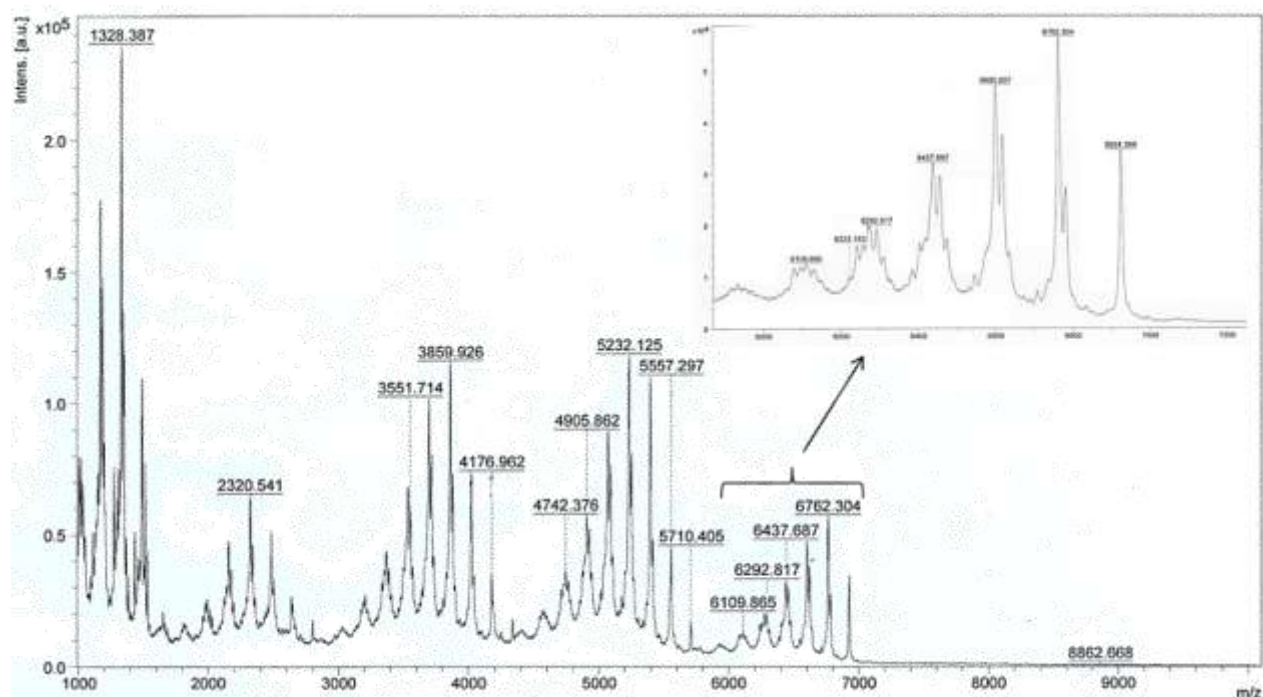


Figure 80. Spectre MALDI-TOF du composé DD- α Fuc₁₆ **67c**

✓ *Etude cinétique de la réaction d'oximation*

Afin d'étudier plus précisément la réaction d'oximation, nous avons réalisé une étude RMN qui nous a permis de déterminer la cinétique de la réaction selon la température. Cette étude a été effectuée sur le chassis tétraaldéhydique en présence de GalNAc α ONH₂ **25**. En effet, pour réaliser les couplages précédents, les unités osidiques avaient été introduites en excès (2 équivalents par site) afin de favoriser la réaction. Cette étude nous a d'abord permis de constater qu'un faible excès (1.2 équivalents) est suffisant pour fonctionnaliser les quatre sites d'ancrage du châssis à 37 °C en 30 min à 20°C (Figure 81).

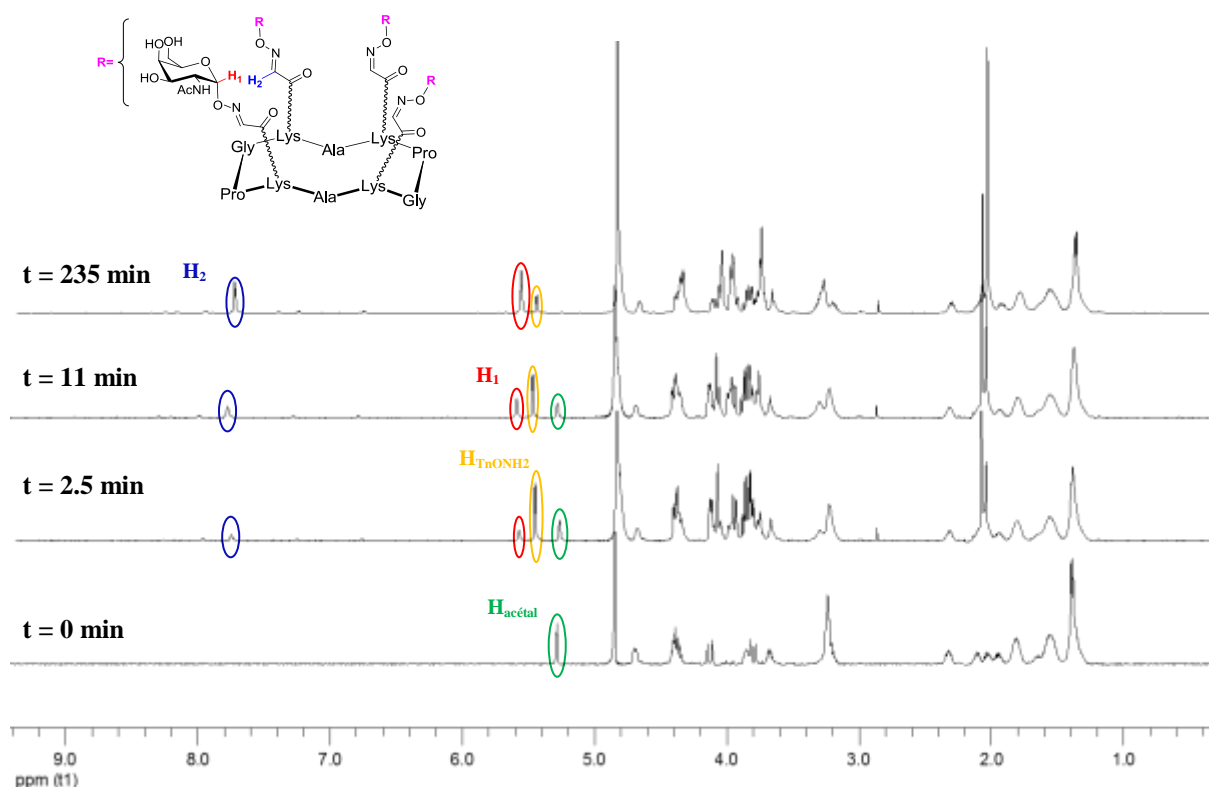


Figure 81. Suivi de la ligation oxime par RMN ^1H à 20°C

Différents signaux caractéristiques nous permettent d'identifier et de suivre la formation du lien oxime à température ambiante ($T=20^\circ\text{C}$). A $t=0$ min, le spectre correspondant au châssis aldéhyde possède un singulet à 5.28 ppm attribué au CH de l'acétal ($\text{H}_{\text{acétal}}$), forme hydrate des fonctions aldéhydes. A la suite de l'introduction du sucre oxyamine à $t=2.5$ min, le signal à 5.47 ppm correspond au proton anomérique du sucre libre ($\text{H}_{\text{TrONH}_2}$) en solution. On constate l'apparition rapide d'un troisième signal à 5.59 ppm appartenant au proton anomérique du sucre lié au châssis (H-1), ce qui engendre simultanément l'apparition d'un autre signal à 7.78 ppm correspondant du proton du lien oxime (H-2). Le suivi de la réaction nous amène à constater la consommation totale du cyclopeptide de départ après 235 min. Deux autres cinétiques de réaction ont été réalisées à $T=0^\circ\text{C}$ et 30°C . Nous avons par cette étude de cinétique pu déterminer différents paramètres de la réaction. L'assemblage du glycocluster avec un ligand oxyamine peut se décrire suivant la réaction générale suivante :



La vitesse de réaction se définit alors par : $v = k * [\text{R'ONH}_2][\text{R4CHO}]$. Nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales avec un excès (1.2 éq./site) de ligand oxyamine. La variation de la concentration en ligand R'ONH_2 peut donc être négligée. La vitesse peut alors

s'écrire : $v = k' * [R4CHO]$ avec $k' = k * [R'ONH_2]$. Nous pouvons ainsi étudier l'évolution de k en fonction de la température $\ln(k) = f(1/T)$ (Figure 82).

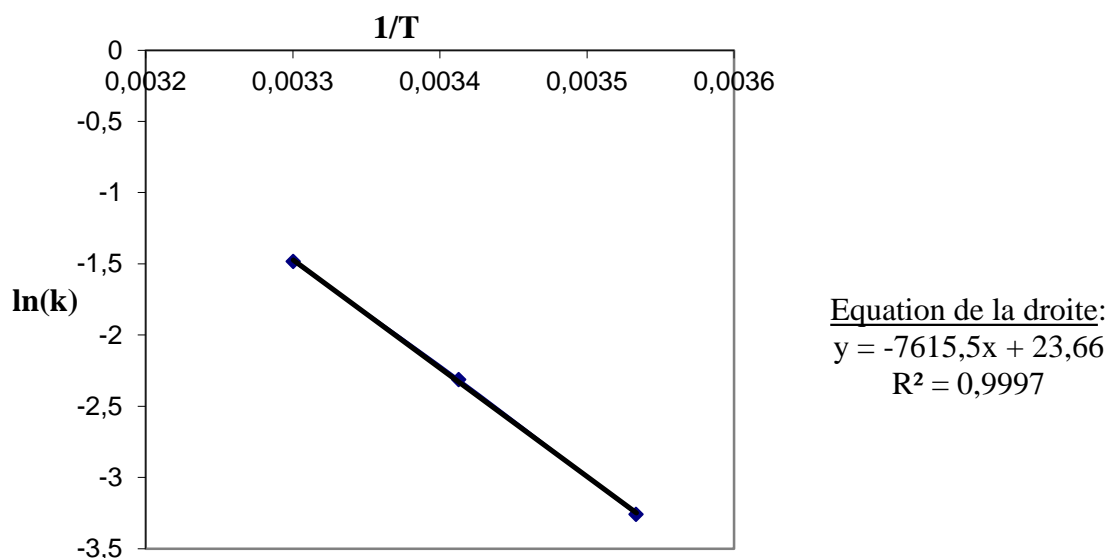


Figure 82. Etude cinétique à température variable du couplage oxime du châssis tétravalent

L'équation correspondante à la droite obtenue nous donne accès à la valeur de l'énergie d'activation E_a . Ceci nous montre que la réaction est d'un pseudo-ordre 1. Nous avons donc une énergie d'activation pour la ligation oxime du composé tétravalent $E_a = 63 \text{ kJ.mol}^{-1}$, ce qui est comparable avec l'énergie d'activation d'une réaction standard. Cette étude cinétique nous a de plus permis de déterminer le temps de réaction optimal dans ces conditions qui est de 60 min en présence 1.2 équivalent par site de sucre oxyamine à 37°C.

✓ *Etude de la stabilité du lien oxime en milieu acide*

A la suite de cette étude cinétique, nous avons étudié la stabilité du lien oxime en milieu acide et plus particulièrement dans les conditions de couplage (0.1% TFA dans l'eau). En effet, nous avons pu constater la formation de sous-produits au cours de certaines synthèses, comme dans le cas du glycoconjugué hexadécavalent mannosylé **64b**.

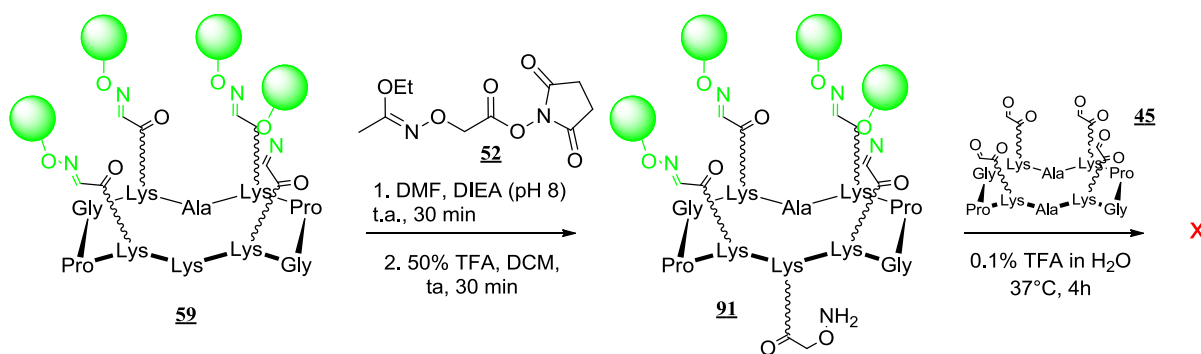


Figure 83. Stratégie convergente de synthèse de glycocluster hexadécavalent **64b**

Dans ce cas, la chaîne latérale de la lysine centrale est fonctionnalisée par le linker oxyamine qui est ensuite déprotégée en milieu acide. Les essais de conjugaison du composé **91** sur le support tétraaldéhyde **45** ne conduit pas au glycocluster **64b** attendu (Figure 83). Le suivi HPLC (Figure 84a) montre en effet que le mélange évolue rapidement vers la formation de sous-produits qui ne sont pas caractérisables par SM. Cependant, nous pensons que cette instabilité peut être attribuée à la présence de la fonction oxyamine dans la molécule qui pourrait favoriser des réactions de trans-oximation en milieu concentré. En effet, même si le lien oxime est connu pour être stable en milieu acide en présence d'oxyamine⁹⁶, nous avons observé par RMN que ce type de composé évolue rapidement en solution vers un mélange de produits difficilement interprétables. L'apparition de nouveaux signaux correspondant à des protons oximes (5.4 ppm) semble confirmer cette hypothèse (Figure 84b).

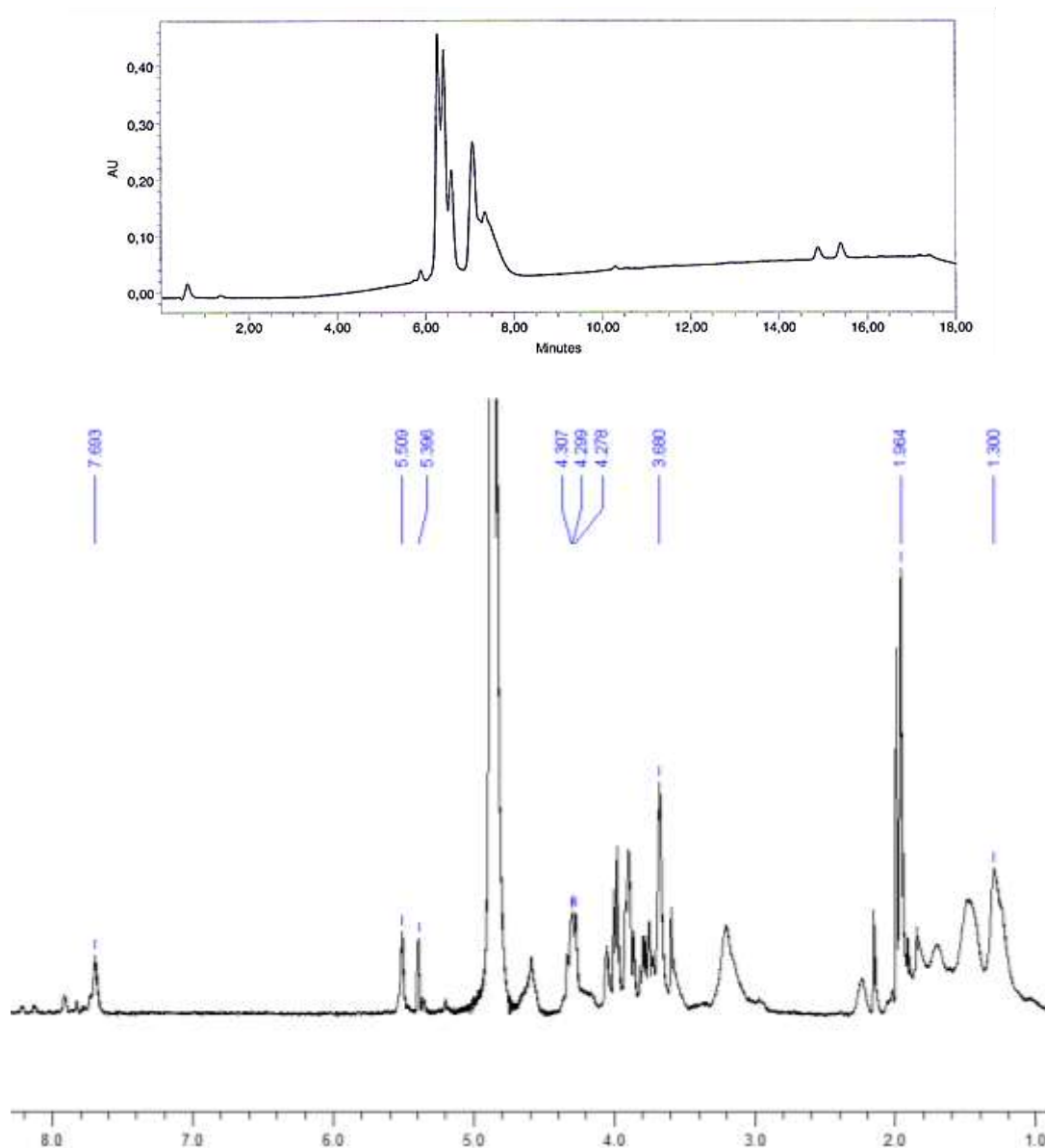


Figure 84. Suivi par HPLC (a) et par RMN (b) de l'évolution du milieu réactionnel en présence de l'oxyamine

Il faut noter qu'en l'absence d'oxyamine dans la molécule, des composés tels que le produit **64b** est stable dans les conditions de couplage (0.1% TFA) puisque son spectre RMN n'évolue pratiquement pas pendant 48h (Figure 85). Une quantité négligeable (environ 3%) de produit correspondant à l'hydrolyse de l'oxime (présence du signal à 5.22 ppm (H_{al})) a été en effet observée, ce qui confirme la stabilité de nos composés pendant 48h dans ces conditions.

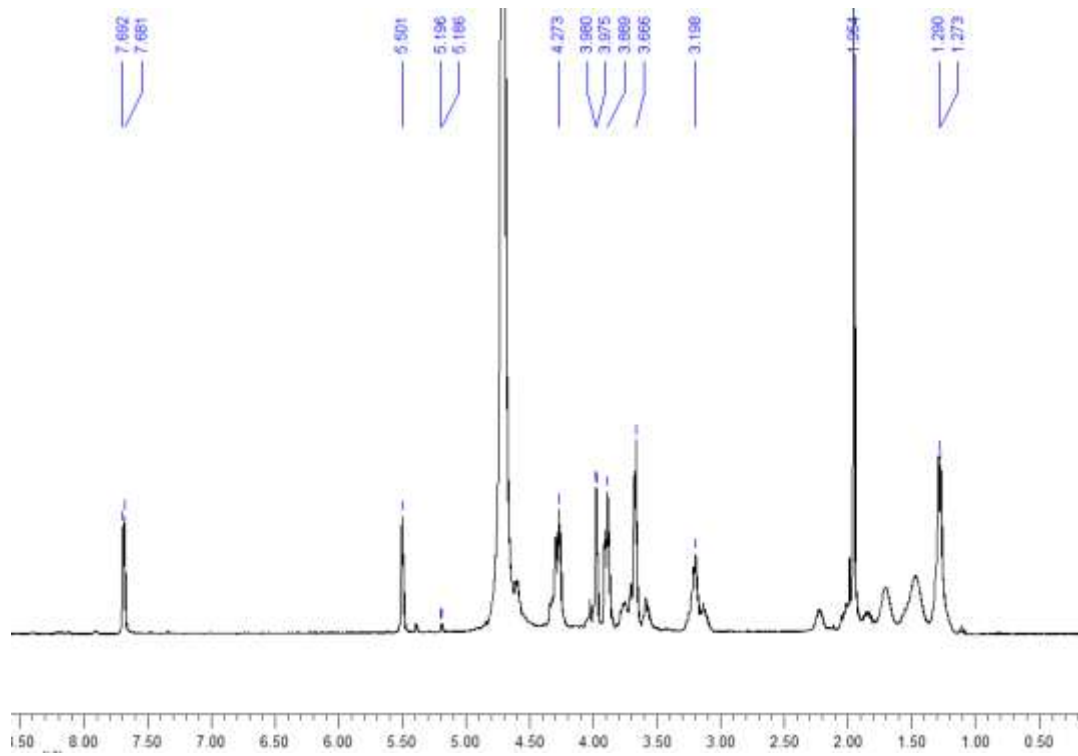


Figure 85. Etude de la stabilité du conjugué $R\text{-}\alpha\text{GalNAc}_4$ en milieu acide par RMN ^1H

✓ Etude RMN du glycocluster $R_{Trz}\text{-}\alpha\text{Fuc}_4$

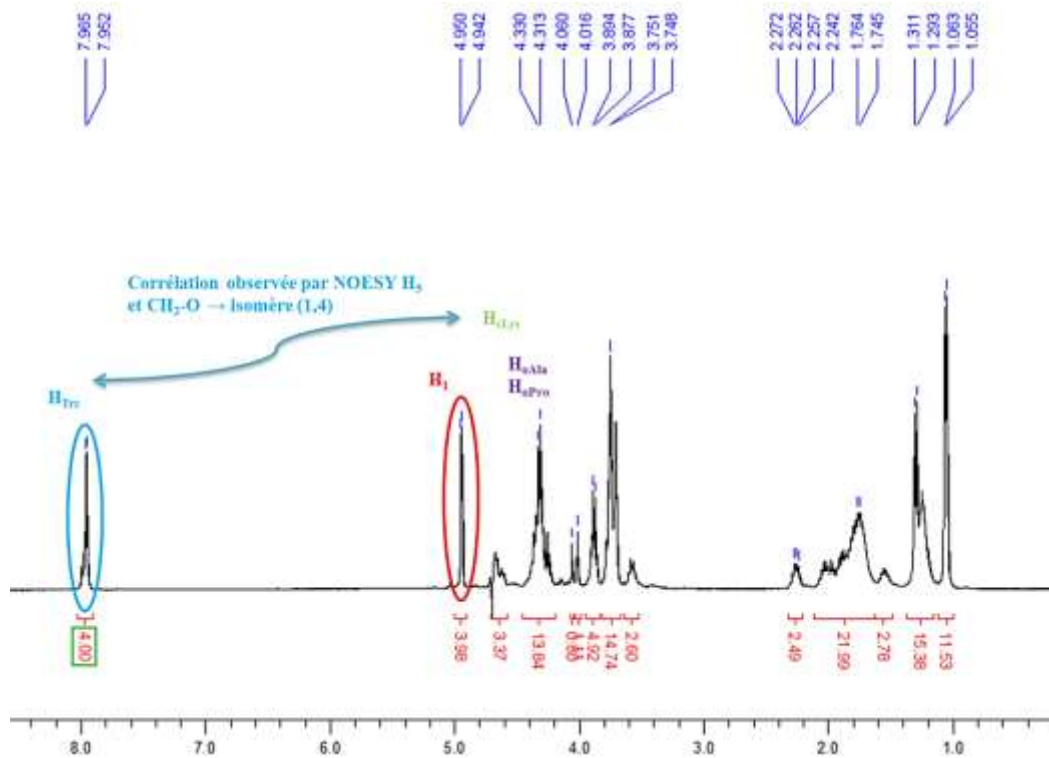


Figure 86. Caractérisation par RMN ^1H du composé $R_{Trz}\text{-}\alpha\text{Fuc}_4$

Les glycoclusters synthétisés par la stratégie CuAAC ont également été caractérisés sans ambiguïté par SM et RMN. En particulier, l'étude NOESY nous a confirmé qu'un seul régioisomère est formé au cours de cette réaction. En effet, des corrélations ont été observées entre le proton du cycle triazole ($H-5_{\text{trz}}$) et le $\text{CH}_{2\epsilon}$ de la norleucine ainsi qu'entre le $H-5_{\text{trz}}$ et le proton du CH_2 de la chaîne propargyle. Ceci confirme bien la formation du régioisomère (1,4) attendu au détriment du régioisomère (1,5) (Figure 86)⁹³.

Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters†

Isabelle Bossu,^a Miroslav Šulc,^b Karel Křenek,^b Emilie Dufour,^a Julian Garcia,^a Nathalie Berthet,^a Pascal Dumy,^a Vladimír Křen^{a,b} and Olivier Renaudet^{a*}

Received 23rd September 2010, Accepted 15th November 2010

DOI: 10.1039/c0ob00772b

Synthetic glycoclusters and their related biological applications have stimulated increasing interest over the last decade. As a prerequisite to discovering active and selective therapeutics, the development of multivalent glycoconjugates with diverse topologies is faced with inherent synthetic and structural characterisation difficulties. Here we describe a new series of molecularly-defined glycoclusters that were synthesized in a controlled manner using a robust and versatile divergent protocol. Starting from a Regioselectively Addressable Functionalized Template (RAFT) carrier, either a polylysine dendritic framework or a second RAFT, then 16 copies of β Gal, α Man, β Lac or cancer-related Thomsen-Freidenreich (α TF) antigen were successively conjugated within the same molecule using oxime chemistry. We thus obtained a new generation of dendri-RAFTs glycoclusters with high glycosidic density and variable spatial organizations. These compounds displaying 16 endgroups were unambiguously characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry. Further biological assays between a model lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) and mannosylated glycoclusters revealed a higher inhibition potency than the tetravalent counterpart, in particular for the hexadecavalent polylysine skeleton. Together with the efficiency of the synthetic and characterisation processes, this preliminary biological study provided clear evidence of promising properties that make the second generation of cyclopeptide-based glycoclusters attractive for biomedical applications.

Introduction

Understanding the carbohydrate/protein interactions that mediate biological processes clearly remains a major challenge in glycobiology. To address this issue and discover new bioactive molecules, extensive multidisciplinary research programs involving both glycobiology and chemistry have been developed over the past decade.¹ Unlike monovalent interactions that are weak and unspecific, it was clearly demonstrated that high selectivity and strong binding enhancement arise from multi-point contacts between clusters of glycans and proteins.² This so-called 'glycoside cluster effect' has deeply inspired the development of synthetic molecules incorporating covalently bound clusters of carbohydrates (glycoclusters) that either mimic or inhibit recognition processes involving bacterial toxins and vegetal or animal lectins,³ sometimes with subnanomolar affinities.⁴ Interestingly, other

studies focusing more on the recognition processes have notably clarified the mechanistic parameters that may occur through chelating, proximity/statistical or clustering effects, depending on the tridimensional structures of both glycocluster and target protein.⁵ While giving useful guidelines, these findings also clearly highlighted that an ideal system for amplified binding remains extremely difficult to design.

Optimization of the biological potency of bio-recognizable glycoclusters closely depends on the number of carbohydrate copies as well as their architecture. To this end, a large variety of synthetic glycoclusters displaying variable topology, valency and density has been explored so far. The typical approach to preparing such glycoconjugates consists of grafting carbohydrates onto either rigid or flexible backbones such as polymers,⁶ calixarenes,⁷ cyclodextrins,⁸ peptide dendrimers,⁹ poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers,¹⁰ cyclopeptides,¹¹ oligonucleotides,¹² fullerenes¹³ or nanoparticles.¹⁴ However, tuning the glycocluster's structure is still faced with inherent difficulties that result from the difficulties in synthesising (*i.e.* chemical incompatibility, regio- and stereoselectivity, incomplete reactions, purifications) and structurally characterising highly glycosylated molecules.

As part of a long-term program to design new bioactive glycoconjugates, we previously reported a first generation of conformationally stable cyclopeptide scaffolds, namely Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFTs),^{11,15} whose lysine side chains of one addressable domain were decorated with four

^aDépartement de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250 and ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: olivier.renaudet@ujf-grenoble.fr; Fax: +33 4 56 52 08 05; Tel: +33 4 56 52 08 33

^bInstitute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videlská 1083, CZ-14220 Praha 4, Czech Republic. E-mail: kren@biomed.cas.cz; Fax: +42 0296442509; Tel: +42 0296442510

† Electronic supplementary information (ESI) available: Sample preparation for MALDI-TOF-MS analysis, analytical data for compounds **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, RK-CHO₁₆, **18**, **19**, **20**, **21**, stability of compound **15** and inhibition curves of ELLA test with ConA. See DOI: 10.1039/c0ob00772b

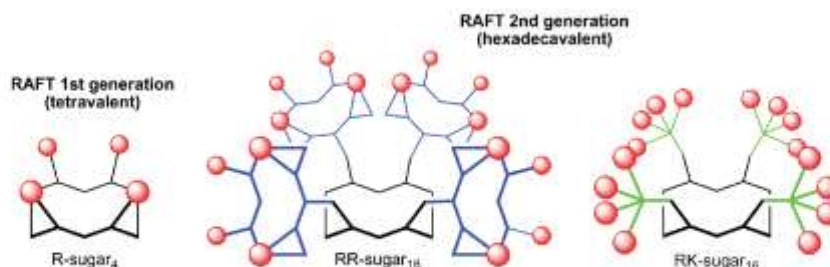


Fig. 1 General structure of the first and the second generation of cyclopeptide-based glycoclusters

copies of either identical¹⁶ or different glycans.¹⁷ Depending on the expected biological application, the incorporation of additional lysine(s) into the cyclopeptide sequence allowed the second addressable domain to be functionalised. Some compounds were thus proved to be very effective immunoactive compounds,¹⁸ albeit exhibiting lectin binding with only modest affinities.^{14,19} In order to improve the recognition properties of those cyclopeptide-based glycoclusters towards lectins in particular, we were interested in the present study to develop new generations of compounds with higher glycosidic valency, density and various levels of rigidity. By analogy to the divergent strategy employed for glycodendrimer fabrication,^{20,26} here we report a modular chemoselective strategy to iteratively introduce either a flexible polylysine framework or a constrained cyclopeptide onto a RAFT core, thus providing two different hyperbranched skeletons in a controlled manner (Fig. 1). Biologically relevant carbohydrates were next conjugated to obtain new series of glycodendrimer-like structures, namely dendri-RAFTs “RK-sugar₁₆” (*i.e.* with the RAFT-polylysine core) and “RR-sugar₁₆” (*i.e.* with the RAFT-RAFT core). The efficiency of the assembly process was demonstrated through the preparation of dendri-RAFTs incorporating sixteen copies of β Gal, α Man, β Lac or Thomsen–Freidenreich (α TF) cancer antigen that were characterized by bi-dimensional NMR experiments, mass spectrometry and probed with a model lectin.

Results and discussion

Synthesis of dendri-RAFTs

In this study, we selected an oxime-based strategy which has proved to be perfectly suitable for the stepwise construction of complex macromolecules, as shown in a wide range of biological applications.²¹ This approach consists of a chemoselective condensation between oxamine- and aldehyde-containing molecules. For the preparation of glycoconjugates,²² free reducing glycans were covalently coupled to oxamine-containing compounds without a prior activation step. Depending on the nature of both oxamine derivative and glycan, the resulting glycoconjugates were either obtained as an open-chain oxime or as a mixture of α/β pyranose/furanose neoglycosides in a molecular ratio that remains difficult to control.²³ Alternatively, an efficient phase-transfer catalysis procedure to stereoselectively incorporate the β -oxamine group at the anomeric carbon was described.²⁴ The resulting glycosylhydroxylamines offer the advantages of being highly reactive with aldehyde- or ketone-containing molecules,²⁵

and more importantly of presenting a pre-defined anomer configuration that is not affected during its conjugation. In our laboratory, we extended the latter strategy by developing an efficient synthetic route to prepare both oxamine α - and β -glycosyls from the corresponding glycosyl fluorides.²⁶ We thus applied this methodology to a series of carbohydrate recognition motifs *i.e.* β Gal 1,²⁷ α Man 2,²⁸ β Lac 3²⁹ and the cancer-related antigen α TF 4,²⁹ which were obtained in 5 to 16 steps then successively conjugated to aldehyde-containing scaffolds using oxime ligation (Fig. 2).

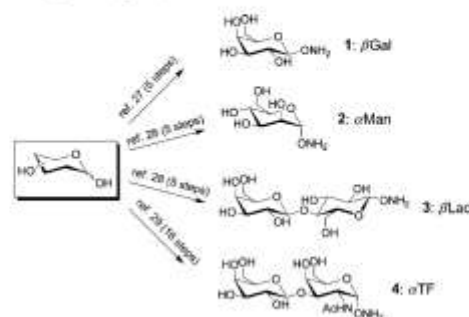
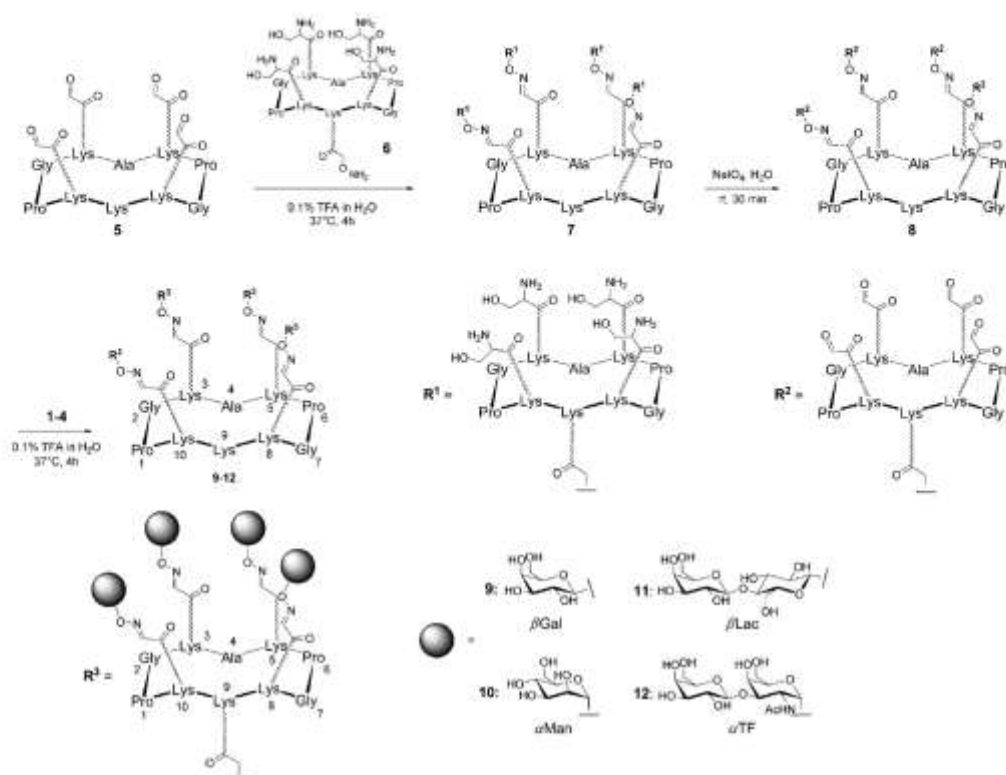


Fig. 2 Structure of oxymino-glycosyls 1–4.

RR series. As mentioned above in the introduction, we designed a second generation of glyco-cyclopeptides by introducing various multivalent peptide skeletons onto the RAFT core in a multistep divergent strategy. Starting from the RAFT-containing aldehyde **5** described earlier,²⁰ we first selected a second RAFT molecule **6**²⁶ containing an oxamine functional group on one addressable domain, whereas four serine residues were used as masked aldehydes on the second domain (Scheme 1).

The ligation was performed in an aqueous buffer containing trifluoroacetic acid (TFA) instead of acetic acid, which was found to react in certain cases with oxamine groups to form the corresponding hydroxamic esters. The expected conjugate **7** was thus obtained in 0.1% TFA in H₂O at 37 °C after 4 h with a quantitative conversion ratio, as proved by HPLC analysis (see the ESI†). In order to avoid time-consuming preparative HPLC to remove the excess of **6**, its oxamine group was simply quenched with acetone to render this compound unreactive in the next step. Aldehyde groups were next generated from **7** by

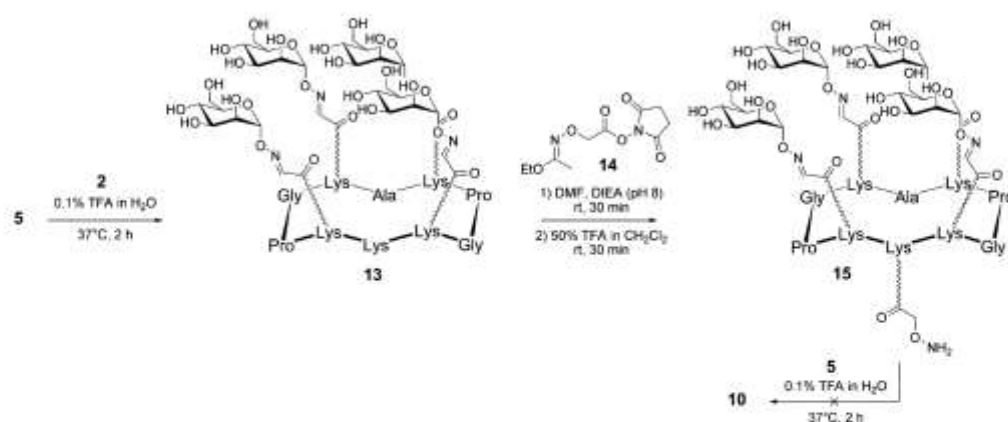
Scheme 1 Divergent strategy for the preparation of the hexadecavalent dendri-RAFTs RR-sugar_n, 9–12

the addition of sodium periodate⁴¹ in the previous crude reaction mixture. This one-pot procedure gave the resulting compound **8** containing sixteen aldehyde groups after 30 min and semi-preparative HPLC, with an excellent yield (92%) and purity. Whereas electrospray ionisation mass spectrometry (ESI) detected the expected multicharged ions for this compound, the ¹H NMR spectrum recorded at 400 MHz in D₂O contained a signal at 5.33 ppm that showed that all sixteen aldehyde groups were present in the hydrate form (see the ESI[†]). We finally generated a series of four original RR-sugar_n glycoclusters varying in their sugar head group. They were prepared from **8** under the oxime coupling conditions described previously using a 10-fold excess of oxymino glycosyls **1–4** to ensure complete cluster formation. The excess of free carbohydrate derivative was finally removed by semi-preparative HPLC purification, producing the hexadecavalent RR-sugar_n, **9–12** in yields ranging from 65 to 88%. Despite steric hindrance generated during the molecular assembly, HPLC traces showed crude mixture without trace of truncated fragment in each case, thus demonstrating the efficiency of our synthetic approach.

As another alternative, we investigated a convergent rather than divergent assembly strategy to assemble mannosylated glycocluster **10** as illustrated in Scheme 2. In this case, tetravalent glycocluster **13** was first prepared by oxime condensation between **5**

and oxymino mannosyl **2**. The side chain of the central lysine was next functionalized with oxymino linker **14**⁴² that was successively deprotected by treatment under mild acidic conditions to yield **15**. Surprisingly, oxime conjugation between this mannosylated glycocluster **15** and **5** to generate the RR-αMan_n, **10** failed under standard ligation conditions. In contrast with the crude mixture of **10** previously obtained using the divergent protocol, HPLC analysis here gave an unclear chromatogram (see the ESI[†]), suggesting that side reactions might occur during the oxime ligation. Whereas oxime linkages are well-known to be stable under mild acidic conditions, even in the presence of a large excess of oxymino derivative,⁴³ we presume that this problem is certainly due to the presence of the oxymino function in the oxime-containing molecule **15** itself, which could promote an intra- or intermolecular *trans*-oximation side reaction. Unfortunately, mass analysis of the reaction mixture did not find any signal to confirm or exclude this hypothesis. Therefore, this result showed this convergent approach to be completely unsuitable for the construction of dendri-RAFTs and prompted us to discard it.

RK series. A second class of hexadecavalent dendri-RAFT RK-sugar_n was then prepared. In this series, a branched polylysine skeleton was attached onto the central RAFT core **16** to provide



Scheme 2 Unsuccessful convergent strategy for the preparation hexadecavalent mannosyl cluster **10** from **15**.

higher flexibility than in the previous RR-sugar_n series, in which a conformationally constrained cyclopeptide was used for carbohydrate presentation. A similar divergent approach including successive periodate oxidation and oxime ligation was thus followed for the construction of these RK-sugar_n derivatives (Scheme 3). The aldehyde-containing molecule **16**¹⁹ was first conjugated with the polylysine dendrimer **17**¹² in 0.1% TFA in H₂O. After 4 h at 37 °C, HPLC analyses showed pure crude reaction mixtures and complete conversion of **16** into the corresponding conjugate. This compound was consecutively oxidized with sodium periodate to yield a dendrimeric skeleton containing sixteen aldehydes, as confirmed by ESI and NMR experiments. The resulting compound was finally glycosylated with oxiamino glycosyls **1–4**, thus producing RK-sugar_n glycoclusters in yields of 69–82% after HPLC purification. As for the construction of the RR-sugar_n series, the coupling reactions with sugars occurred cleanly and no trace of undesired products due to *trans*-oximation side reaction or partial conjugation was observed by analytical HPLC.

Glycocluster characterization

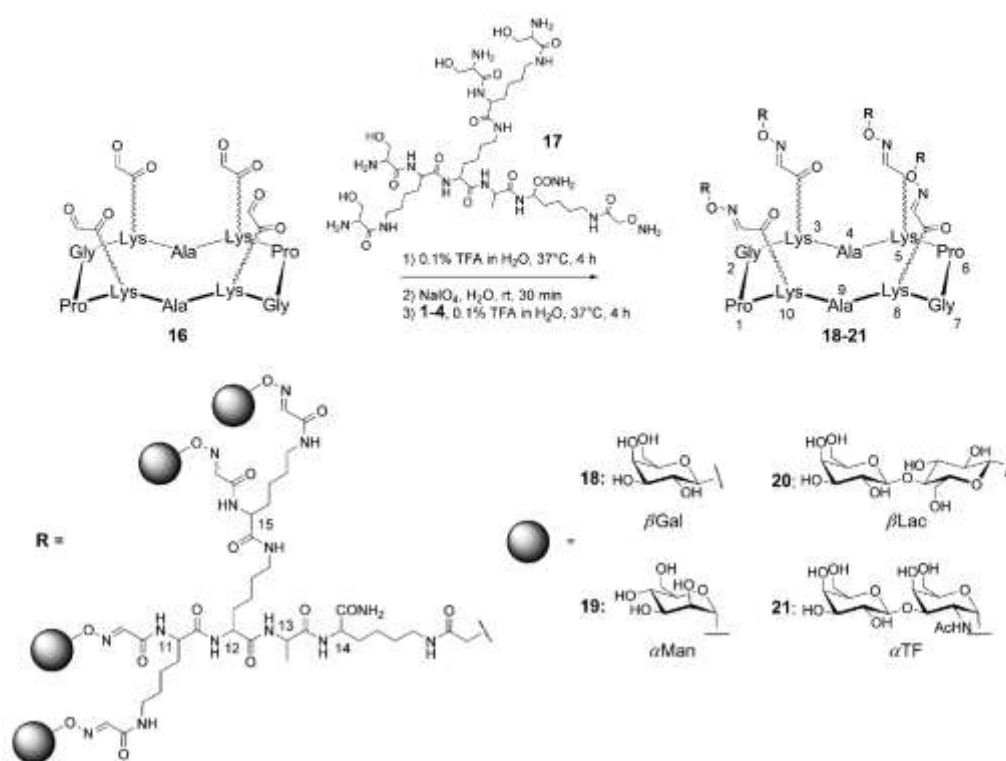
One major limitation of the construction of complex macromolecules resides not only in the steric hindrance created during stepwise synthesis, but also in characterization difficulties using both NMR spectroscopy and mass spectrometry. This problem is intensified with large molecules containing multiple glycosylation sites such as glycoproteins.²⁴ Due to their high molecular weight (7.6–12.5 kDa) and carbohydrate density, our dendri-RAFTs were found to be subject to similar characterisation difficulties.

Final coupling assessment. While the expected number of aldehyde groups was confirmed with ¹H NMR spectroscopy and ESI spectrometry, the completeness of the final glycosylation had to be ascertained, since partial defects could presumably be difficult to detect.^{10a} To confirm reaction completion, high-field NMR spectroscopy experiments were performed in D₂O. While the low structural symmetry of both series of dendri-RAFTs **9–12** and **18–21** strongly complicate the signals' resolution and multiplicity in the ¹H NMR spectra, COSY experiments enabled

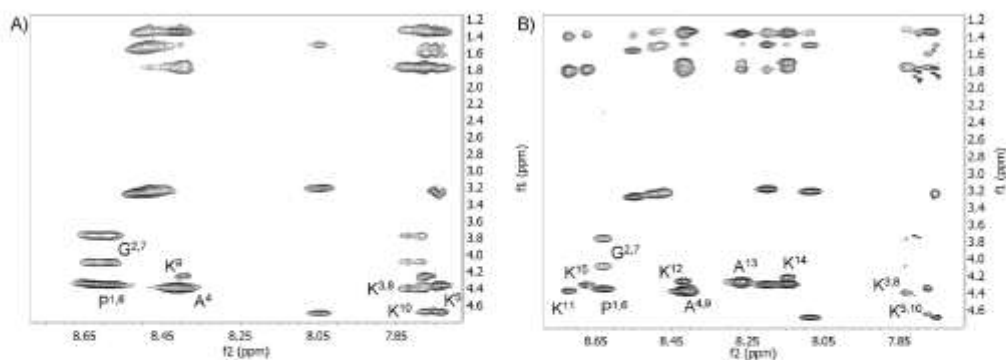
the unambiguous assignment of characteristic signals that correspond to the anomeric and oxime protons. For each compound, the integration of both signals (20 oxime protons and 16 anomer protons) was in perfect agreement with the presence of 16 sugar head groups.

¹H NMR resonance assignments. Complete bidimensional NMR studies were next performed for mannosylated compounds **10** and **19**. NMR data revealed a four-fold pseudo-symmetry that resulted in an equivalent magnetic environment for symmetry-related protons and, therefore, a dramatic degeneration of chemical shifts. This was particularly true for compound **10**, for which only one cyclodecapeptide is observable. The individual spin systems of peptide fragments were assigned based on an analysis of through-space nuclear Overhauser effect (NOESY) and through-bond correlated (DQF-COSY, TOCSY) spectra using well-established sequential strategy methods.³⁵ Nonpeptidic amide bonds, e.g. between two lysines *via* an oxime linker, were confirmed by visualising NOE correlations from the NH₂ proton of the lysine side chain and the N=CH or the CH₂O protons of the oxime bond (Fig. 3). The assigned resonances are given in Table 1 for compound **10** and in Table 2 for compound **19**.

Structural calculations. While symmetry degeneration greatly simplifies resonance assignment, structure calculations are more complicated, since it becomes difficult to distinguish intramolecular correlations from intermolecular ones. However, distance constraints were unambiguously determined for both compounds, particularly between two lysines linked by their side chains, hence allowing correct orientation of the oxime bond. Models of the solution structures were obtained and are represented in Fig. 4. For more clarity, the four dendritic arms highlighted in yellow were spread widely. The resulting molecular models clearly show interesting differences, albeit showing similar size. Firstly, the cluster of sugars in RR- α Man₁₆ **10** appears more rigid and constrained than in **19**, presumably because the cyclopeptide skeleton prevents flexibility. In contrast the structure of the second RK- α Man₁₆ **19** is apparently much more flexible due to the presence of the polylysine core. Secondly, even if the number of



Scheme 3 Divergent strategy for the preparation of the hexadecavalent dendri-RAFTs RK-sugar, 18-21.

Fig. 3 Expanded regions of NOESY spectra (500 MHz) in a 95% H₂O/5% D₂O mixture showing NH- α and NH-side chain correlations. A) RR- α Man₁₆ **10**. B) RK- α Man₁₆ **19**. Residue numbering is given in Scheme 1 and 2, respectively.

mannosyl derivatives is identical in both molecules, the cluster density seems to be rather different, as shown by the sugar distribution onto the scaffold. The maximal distance between sugar moieties, that represents the upper distance limits, can indeed be estimated to be approximately 80 Å and 70 Å for

RR- α Man₁₆ **10** and RK- α Man₁₆ **19**, respectively, whereas the sugars appear closer to each other in RR- α Man₁₆ **10**. We presume that these differences in both cluster rigidity and carbohydrate presentation might impact on their recognition properties with lectins.

Table 1 Proton chemical shift assignments for compounds RR- α Man_n 10^a

| Residue ^b | HN | H α | H β | H γ | Others |
|-----------------------|------------|------------|------------|-------------|---|
| Pro-1,6 | | 4.36 | 2.03, 2.31 | 1.97, 2.11 | CH ₂ δ 3.66, 3.84 |
| Gly-2,7 | 8.64 | 3.78, 4.09 | | | |
| Lys-3,8 | 7.83 | 4.40 | 1.80 | 1.33 | CH ₂ δ 1.53; CH ₂ ϵ 3.28; NH ζ 8.53 |
| Ala-4 | 8.45 | 4.38 | 1.36 | | |
| Lys-5 | 7.78 | 4.67 | 1.65, 1.79 | 1.40 | CH ₂ δ 1.56; CH ₂ ϵ 3.29; NH ζ 8.50 |
| Lys-9 | 8.43 | 4.26 | 1.78 | 1.38 | CH ₂ δ 1.52; CH ₂ ϵ 3.24; NH ζ 8.08 |
| Lys-10 | 7.80 | 4.68 | 1.63, 1.78 | 1.36 | CH ₂ δ 1.53; CH ₂ ϵ 3.29; NH ζ 8.53 |
| CH ₂ -O-ox | 4.70 | | | | |
| N=CH-ox | 7.76, 7.79 | | | | |
| α Man | 5.53 (H1) | 4.14 (H2) | 3.81 (H3) | 3.65 (H4,5) | 3.76, 3.84 (H6a, H6b) |

^a Proton assignments are in H₂O at 25 °C. ^b Residue numbering is given in Scheme 1.

Table 2 Proton chemical shift assignments for compounds RK- α Man_n 19^a

| Residue ^b | HN | H α | H β | H γ | Others |
|-----------------------|------------|------------|------------|-------------|---|
| Pro-1,6 | | 4.37 | 2.03, 2.30 | 2.02, 2.08 | CH ₂ δ 3.64, 3.83 |
| Gly-2,7 | 8.63 | 3.77, 4.09 | | | |
| Lys-3,8 | 7.83 | 4.40 | 1.75, 1.78 | 1.36 | CH ₂ δ 1.51; CH ₂ ϵ 3.24; NH ζ 8.47 |
| Ala-4,9 | 8.41 | 4.36 | 1.35 | | |
| Lys-5,10 | 7.78 | 4.65 | 1.62, 1.75 | 1.36 | CH ₂ δ 1.53; CH ₂ ϵ 3.25; NH ζ 8.49 |
| Lys-11 | 8.72 | 4.38 | 1.81 | 1.40 | CH ₂ δ 1.56; CH ₂ ϵ 3.28; NH ζ 8.56 |
| Lys-12 | 8.42 | 4.26 | 1.79 | 1.36 | CH ₂ δ 1.50; CH ₂ ϵ 3.19; NH ζ 8.21 |
| Ala-13 | 8.27 | 4.27 | 1.37 | | |
| Lys-14 | 8.14 | 4.22 | 1.70, 1.78 | 1.37 | CH ₂ δ 1.50; CH ₂ ϵ 3.08; NH ζ 8.22 |
| Lys-15 | 8.67 | 4.31 | 1.79 | 1.38 | CH ₂ δ 1.56; CH ₂ ϵ 3.28; NH ζ 8.60 |
| CH ₂ -O-ox | 4.69 | | | | |
| N=CH-ox | 7.76, 7.80 | | | | |
| α Man | 5.53 (H1) | 4.12 (H2) | 3.81 (H3) | 3.63 (H4,5) | 3.77, 3.85 (H6a, H6b) |

^a Proton assignments are in H₂O at 25 °C. ^b Residue numbering is given in Scheme 2.

MALDI-TOF characterization. While the peptide intermediates and the first generation of tetravalent glycoclusters reported previously^{16,18} were easily analysed by routine ESI, direct mass analysis of these dendri-RAFTs compounds failed using similar ESI procedures. This difficulty can certainly be attributed to the presence of only one free lysine side-chain in dendri-RAFTs 9–12, whereas dendri-RAFTs 18–21 contain no protonation site. In addition, together with the presence of salts, the well-known fragmentation of oxime linkages observed by a tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer with electrospray ion source (ESI-QqTOF)¹⁶ might cause a distribution of the molecular ion signals between several species, thus precluding any signal detections. Therefore, we expected that matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) experiments would give better results. Despite inherent difficulties associated with the MALDI detection of glycopeptides, it was demonstrated that a suitable choice of parameters, including the desorption matrix, sample preparation, pH and instrumental conditions can significantly improve the analysis of glycoconjugates.¹⁷

Their average molecular weight was thus successfully determined by MALDI-TOF. To perform these analyses, sample pre-treatment in an OligoR3 microcolumn using a pH 8.1, 100 mM ammonium acetate buffer and 2,5-dihydroxybenzoic acid as the MALDI matrix was necessary to yield MALDI-TOF positive spectra in linear mode. We thus obtained clean mass spectra showing the expected molecular peak for each glycocluster with

partial fragmentation. All samples revealed a m/z signal of [M+Na]⁺ except for dendri-RAFT RK- α TF_n 21, which interestingly produced a [M+Na₂]⁺ molecular ion when applying the same experimental approach prior to MS analysis (Table 3).

On the other hand, the use of POROS 20 R2 (Applied Biosystems, CA, USA) or Carbograp (Grace, IL, USA) resin and also various washing protocols (0.1% ammonia solution, 0.1% ammonium acetate without pH adjustment, pure water, 0.1% acetic acid or 0.1% trifluoroacetic acid instead of pH 8.1, 100 mM ammonium acetate buffer) provided no or very poor MS signals. Based on optimization experiments on the pre-cleaning method, we can conclude that not only the type of chromatography resin but also type of washing buffer used and its pH strongly affected the obtained MS data. However, it should be mentioned that the sample RR- α TF_n 12 did not produce any MS signal whatever the method.

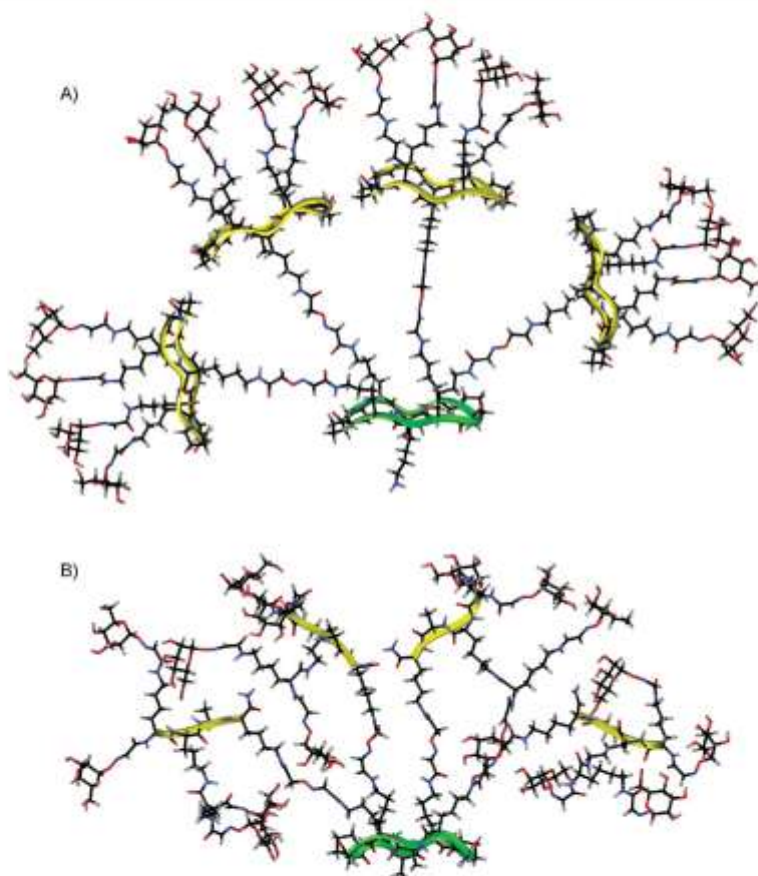
Biological evaluation of mannosylated dendri-RAFT with ConA

To probe the binding properties of our dendri-RAFT, we chose a model lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) whose mannose binding sites are separated by about 65 Å, hence appearing suitable for multivalent interactions with our glycoclusters. Hexadecavalent dendri-RAFTs RR- α Man_n 10 and RK- α Man_n 19 were tested and compared with the tetravalent mannosylated compound R- α Man₄ 13 using Enzyme-Like Lectin Assays (ELLA).¹⁸ Methyl α -D-mannopyranoside was used as monovalent reference.

Table 3 MALDI-TOF MS analysis of RR-sugar_n **9–12** and RK-sugar_n **18–21***

| Compound | Formula | Calculated average mass | Experimental mass | Error (ppm) |
|--------------------------------|--|-------------------------|---------------------|-------------|
| RR-βGal _n 9 | C ₂₇₁ H ₄₀₇ N ₂₉ O ₇₁₃ Na | 9299.4983 | 9297.7 | 165 |
| RR-αMan _n 10 | C ₂₇₁ H ₄₀₇ N ₂₉ O ₇₁₃ Na | 9299.4983 | 9298.0 | 161 |
| RR-βLac _n 11 | C ₄₇₁ H ₇₄₇ N ₅₉ O ₂₂₄ Na | 11893.7767 | 11892.5 | 107 |
| RR-αTF _n 12 | C ₉₇ H ₁₅₁ N ₁₇ O ₂₅₉ O ₂₉₄ | | <i>not detected</i> | |
| RK-βGal _n 18 | C ₂₆₆ H ₄₀₁ N ₂₇ O ₇₁₃ Na | 7564.4792 | 7563.4 | 142 |
| RK-αMan _n 19 | C ₂₆₆ H ₄₀₁ N ₂₇ O ₇₁₃ Na | 7564.4792 | 7563.7 | 103 |
| RK-βLac _n 20 | C ₃₀ H ₄₇ N ₇ O ₂₀ Na | 10158.7576 | 10156.9 | 183 |
| RK-αTF _n 21 | C ₂₉ H ₃₈ N ₆ O ₂₄ Na | 10838.5883 | 10836.5 | 192 |

* MALDI-TOF MS data were obtained in 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix and all samples revealed a signal of [M+Na]⁺, except the sample RK-αTF_n **21** which provided a [M+Na₂]⁺ using the approach described in the Experimental Section. The sample RR-αTF_n **12** did not reveal any MS signal.

**Fig. 4** Molecular modelling of: A) RR-αMan_n **10**. B) RK-αMan_n **19**.

This experiment measured the ability of serially diluted glycoclusters to inhibit the binding between ConA labelled with horseradish peroxidase (HRP) and a polymeric mannosylated ligand (PAA-αMan) immobilized on the microtiter well. We thus obtained an IC₅₀ value that corresponds to the concentration necessary for 50%

inhibition and is assumed to be proportional to the corresponding binding affinities.

As summarized in Table 4, the tetravalent compound R-αMan₄ **13** exhibited a modest IC₅₀ (58 μM), which was only slightly better than the methyl-α-D-mannopyranoside (199 μM). Indeed,

Table 4 ELLA data for binding inhibition of ConA-HRP with mannose-glycoclusters^a

| Compound | <i>n</i> ^b | IC ₅₀ /μM | Rel. pot. ^c | Rel. pot./sugar ^d |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------------------|
| αManOMe | 1 | 199 | 1.0 | 1.0 |
| R-αMan ₆ 13 | 4 | 58 | 3.4 | 0.8 |
| RR-αMan ₆ 10 | 16 | 3.6 | 55.3 | 3.4 |
| RK-αMan ₆ 19 | 16 | 0.7 | 284 | 17.7 |
| RR-βGal ₆ 9 | 16 | No inhibition | — | — |

^a Each experiment was performed in triplicate. ^b Number of sugar units in the ligand. ^c Relative potency = IC₅₀(αManOMe)/IC₅₀(dendrimer). ^d Relative potency/sugar = relative potency/*n*.

this result is in perfect agreement with previous fluorescence anisotropy¹⁶ and SPR¹⁸ studies showing that the multivalent effect of this tetravalent glycocluster is almost negligible with ConA. More interestingly, inhibitory potencies were obtained with hexadecavalent RR-αMan₆ **10** (IC₅₀ 3.6 μM), whereas the most significant effect was observed with RK-αMan₆ **19** (IC₅₀ 0.7 μM). Their relative inhibitory potencies were 55 and almost 300 times better than methyl-α-D-mannopyranoside, respectively. When the relative potencies were expressed in terms of the number of mannose residues in each hexadecavalent molecule, the level of inhibition was 3.4- and 17.7-fold higher with compounds **10** and **19**, respectively. Taken together, these results clearly indicate that a multivalent effect is occurring in the presence of a hexadecavalent structure, in particular with compound **19**. It should also be mentioned that RR-βGal₆ **9** was evaluated as the negative control, since galactosylated ligands do not bind to ConA. No inhibition was observed with this compound. This confirms that inhibitory effects can be attributed to the mannose headgroup and its presentation instead of the dendritic skeleton itself.

Conclusions

A new generation of structurally diverse glycoclusters was described and studied in this paper. Two series of dendri-RAFTs composed of polylysine (RK series) or cyclopeptide (RR series) skeletons attached to a central cyclopeptide platform were designed and synthesized in a controlled manner using an efficient divergent protocol. Both families provided sixteen anchoring sites that were easily functionalized by oximation with several carbohydrate moieties, those being βGal, αMan, βLac or cancer-related Thomsen–Freidenreich (TF). We thus obtained novel hexadecavalent dendri-RAFTs differing in their spatial arrangement and glycosidic density as shown by NMR spectroscopy and structural calculations. Despite being heavily glycosylated, these compounds were next treated using an optimized pre-cleaning protocol that allowed their unambiguous structural characterization by MALDI-TOF-MS. It should be mentioned that the oxime instability observed during MS analyses, in particular under highly acidic conditions, does not preclude the utilization of oxime-containing compounds *in vitro* and *in vivo*.¹⁹ To evaluate their binding properties, preliminary recognition assays were finally performed with the model lectin ConA. In comparison with the mannoseylated tetravalent structure **13**, which showed negligible multivalent interaction with ConA, hexadecavalent structures exhibited a significant binding improvement, in particular with RK-αMan₆ **19**. This result clearly confirms that not only the

carbohydrate copy number, but also the tridimensional structure of the glycocluster affects its recognition properties. Although these hexadecavalent compounds only differ in their peptide skeleton, the higher inhibition potency induced by **19** might indeed be explained by the higher degree of freedom of carbohydrates and a suitable distribution for multivalent interaction. Together with the efficiency of both assembly and characterization protocols, these results clearly showed interesting recognition properties that pave the way to the development of relevant biological applications. In particular, intensive research towards the design of potent inhibitors capable of blocking the early stage of pathogen infections is currently underway in our laboratory.

Experimental

Materials and general procedures

All chemical reagents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France) and were used without further purification. Protected amino acids and Fmoc-Gly-Sasrin resin were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP was purchased from France Biochem. HRP-labelled Concanavalin A (ConA-HRP), Bovine Serum Albumin (BSA), methyl α-D-mannopyranoside and SIGMA F45T OPD were purchased from Sigma-Aldrich. Polymeric α-D-mannose (PAA-α-D-Man) was obtained from Lectinity Holding, Inc., Moscow. Optical density was measured with a microtiter plate reader (SPECTRAMax, model PLUS384, Molecular Devices). Reaction progress was monitored by reverse-phase HPLC on Waters equipment using C₁₈ columns. Analytical and preparative separation was carried out at 1.3 mL min⁻¹ (Nucleosil 120 Å 3 μm C₁₈ particles, 30 × 4.6 mm²) and at 22 mL min⁻¹ (Delta-Pak 300 Å 15 μm C₁₈ particles, 200 × 25 mm²) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a linear A–B gradient (buffer A: 0.09% CF₃CO₂H in water; buffer B: 0.09% CF₃CO₂H in 90% acetonitrile). Each intermediate peptide was analyzed by mass spectrometry using electrospray ionization on a VG Platform II in positive mode. Mass spectra for hexadecavalent glycoclusters were acquired on a Bruker-Daltonics MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (linear mode) after sample pre-treatment in an OligoR3 microcolumn (Applied Biosystems, USA) using 2,5-dihydroxybenzoic acid as the matrix. ¹H NMR spectra were recorded in D₂O at 400 MHz with a Bruker Avance 400. TOCSY, DQF-COSY and NOESY for compounds **10** and **19** were obtained in 95% H₂O/5% D₂O at 500 MHz with a Varian Unity plus spectrometer.

Preparation of aldehyde scaffold RR-CHO₆ (**8**)

A solution of R-CHO₆Lys **5** (5.7 mg, 4.0 μmol) and R-Ser₆ONH₂ **6** (48.2 mg, 24.0 μmol) was stirred at 37 °C in 0.1% TFA in H₂O (4 mL, v/v). After 4 h, analytical HPLC found the quantitative conversion of **5** into the RR-Ser₆ **7**. Analytical HPLC: R_t: 5.5 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); ESI⁺-MS: calcd. for C₂₆₈H₃₆₆N₂₄O₃₆ 6939.0, found: *m/z* 6940.5 [M+H]⁺. After the addition of acetone (100 μL) to the crude reaction mixture, compound **7** was oxidized with sodium periodate (205 mg, 0.96 mmol) at room temperature. The crude mixture was finally purified by semi-preparative HPLC after 1 h to obtain the

aldehyde-containing peptide RR-CHO₁₆ **8** (25 mg, 92%). Analytical RP-HPLC: *R*_f: 5.8 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); semi-preparative HPLC: *R*_f: 15.0 min (gradient: 5 to 60% B in 30 min); ESI⁺-MS: calcd. for C₂₀₃H₃₂₈N₃₀O₁₄ 6442.0, found: *m/z* 6460.3 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.82–7.77 (m, 4 H, 4xHox), 5.33–5.31 (m, 16 H, 16xCH(OH)₂), 4.77–4.73 (m, 8 H, 4xCH₂O), 4.50–4.33 (m, 30 H, 30xH₄), 4.16 (d, 10 H, ²*J*_{H₃H₂} = 17.7 Hz, 10xH₃), 3.94–3.78 (m, 20 H, 10xH₅ and 10xH₆), 3.76–3.67 (m, 10 H, 10xH₆), 3.36–3.18 (m, 48 H, 24xCH₂), 3.04 (t, 2 H, ²*J*_{H₃H₂} = 7.7 Hz, CH₂), 2.30–2.41 (m, 10 H, 10xH₆), 2.20–1.30 (m, 205 H).

Preparation of hexadecaivalent RR-sugar₁₆ (9)–(12)

RR-βGal₁₆ (9). The aldehyde-containing peptide **8** (4.0 mg, 0.58 μmol) was dissolved in 0.1% TFA in H₂O (0.6 mL, v/v) and βGal I (3.6 mg, 18.5 μmol) was added to the mixture which was stirred at 37 °C. After 4 h, semi-preparative HPLC of the crude mixture yielded the hexadecaivalent galactosyl cluster **9** (4.5 mg) in an 82% yield. Analytical RP-HPLC: *R*_f: 5.6 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); semi-preparative HPLC: *R*_f: 12.6 min (gradient: 5 to 60% B in 30 min); δ = 7.88–7.78 (m, 20 H, 20xHox), 5.18–5.12 (m, 16 H, 16xH1), 4.49–4.29 (m, 30 H, 30xH₄), 4.15 (d, 10 H, ²*J*_{H₃H₂} = 17.6 Hz, 10xH₃), 4.05–4.02 (m, 16 H, 16xH4), 3.93–3.65 (m, 110 H, 16xH2, 16xH3, 16xH5, 32xH6, 10xH₅, 20xCH₂), 3.38–3.23 (m, 48 H, 24xCH₂), 3.04 (t, 2 H, ²*J*_{H₃H₂} = 8.0 Hz, CH₂), 2.41–2.30 (m, 10 H, 10xH₆), 2.18–1.30 (m, 205 H); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₂₀₃H₃₀₀N₃₀O₁₇ 9276.508, found: *m/z* 9297.7 [M+Na]⁺.

RR-αMan₁₆ (10). Compound **10** (6.0 mg, 88%) was obtained by following a similar procedure. Analytical HPLC: *R*_f: 5.7 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); semi-preparative HPLC: *R*_f: 13.1 min (gradient: 5 to 60% B in 30 min); ¹H NMR resonance assignments are given in Table 1; MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₂₀₃H₃₀₀N₃₀O₁₇ 9276.508, found: *m/z* 9298.0 [M+Na]⁺.

RR-βLac₁₆ (11). Compound **11** (4.7 mg, 68%) was obtained by following a similar procedure. Analytical RP-HPLC: *R*_f: 5.4 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); semi-preparative HPLC: *R*_f: 12.0 min (gradient: 5 to 60% B in 30 min); ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.89–7.77 (m, 20 H, 20xHox), 5.27–5.21 (m, 16 H, 16xH1), 4.76–4.74 (m, 8 H, 4xCH₂O), 4.52 (d, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 7.7 Hz, 16xH1), 4.50–4.30 (m, 30 H, 30xH₄), 4.15 (d, 10 H, ²*J*_{H₃H₂} = 17.6 Hz, 10xH₃), 4.06–3.96 (m, 36 H, 16xH4, 10xH₅, 10xH₆), 3.94–3.75 (m, 138 H, 16xH3, 16xH4, 16xH5, 16xH5, 32xH6, 32xH6, 10xH₆), 3.72 (dd, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 3.4 Hz, ²*J*_{H₃H₄} = 9.9 Hz, 16xH3), 3.67–3.58 (m, 32 H, 16xH2, 16xH2), 3.38–3.22 (m, 48 H, 24xCH₂), 3.04 (t, 2 H, ²*J*_{H₃H₂} = 7.7 Hz, CH₂), 2.42–2.30 (m, 10 H, 10xH₆), 2.20–1.30 (m, 205 H); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₂₀₃H₃₀₀N₃₀O₁₇ 11870.7870, found: *m/z* 11892.5 [M+Na]⁺.

RR-αTF₁₆ (12). Compound **12** (3.6 mg, 65%) was obtained by following a similar procedure. Analytical HPLC: *R*_f: 5.5 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); semi-preparative HPLC: *R*_f: 11.6 min (gradient: 5 to 60% B in 30 min); ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.83–7.78 (m, 20 H, 20xH_{ox}), 5.64–5.60 (m, 16 H, 16xH1), 4.75–4.73 (m, 8 H, 4xCH₂O), 4.60–4.53 (m, 32 H, 16xH1, 16xH2), 4.49–4.29 (m, 46 H, 16xH4, 30xH₄), 4.19–4.09 (m, 26 H,

16xH3, 10xH₆), 4.05 (bt, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 6.0 Hz, 16xH5), 3.97 (bd, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 3.1 Hz, 16xH4), 3.87–3.64 (m, 126 H, 16xH3, 16xH5, 32xH6, 32xH6, 10xH₅, 20xCH₂), 3.59 (bt, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 7.8 Hz, 16xH2), 3.40–3.19 (m, 48 H, 24xCH₂), 3.08–3.02 (m, 2 H, CH₂), 2.39–2.27 (m, 10 H, 10xH₆), 2.18–1.23 (m, 253 H); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): no signal was detected.

Preparation of the aldehyde scaffold RK-CHO₁₆

The aldehyde-containing RK-CHO₁₆ was prepared successively after oxime conjugation between R-CHO₂Ala₂ **16** (5.0 mg, 4.0 μmol) and polyKSer₁₆ONH₂ **17** (38.1 mg, 24.0 μmol) (RK-Ser₁₆): Analytical HPLC: *R*_f: 7.4 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); ESI⁺-MS (positive mode): calcd for C₂₁₃H₃₅₈N₃₂O₁₄ 5203.9, found: *m/z* 5204.3 [M+H]⁺ then oxidation with sodium periodate following the procedures described for **8**. Analytical HPLC: *R*_f: 8.3 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); semi-preparative HPLC: *R*_f: 13.6 min (gradient: 5 to 40% B in 30 min); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.77–7.76 (m, 4 H, 4xH_{ox}), 5.34 (s, 8 H, 8xCH(OH)₂), 5.28 (s, 8 H, 8xCH(OH)₂), 4.75–4.68 (m, 8 H, 4xCH₂O), 4.40–4.20 (m, 28 H, 28xH₄), 4.12 (d, 2 H, ²*J*_{H₃H₂} = 17.5 Hz, 2xH₃), 3.88–3.63 (m, 6 H, 2xH₅, 2xCH₂), 3.30–3.18 (m, 40 H, 20xCH₂), 2.92–2.36 (m, 8 H, 2xCH₂, 2xCH₂), 1.75–1.27 (m, 138 H); ESI⁺-MS: calcd for C₂₀₃H₃₀₀N₃₀O₁₇ 4707.0; found: *m/z* 4707.8 [M+H]⁺.

Preparation of hexadecaivalent RK-sugar₁₆ (18)–(21)

RK-βGal₁₆ (18). Compound **18** (7.0 mg, 77%) was obtained by following the oxime ligation procedure described for **9**. Analytical HPLC: *R*_f: 8.0 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); semi-preparative HPLC: *R*_f: 12.4 min (gradient: 5 to 40% B in 30 min); ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.88–7.77 (m, 20 H, 20xH_{ox}), 5.15–5.12 (m, 16 H, 16xH1), 4.76–4.71 (m, 8 H, 4xCH₂O), 4.45–4.23 (m, 28 H, 28xH₄), 4.12 (d, 2 H, ²*J*_{H₃H₂} = 17.8 Hz, 2xH₃), 4.03–3.99 (m, 16 H, 16xH4), 3.89–3.70 (m, 86 H, 16xH2, 16xH3, 16xH5, 32xH6, 2xH₅, 2xCH₂), 3.35–3.20 (m, 40 H, 20xCH₂), 2.35–1.32 (m, 146 H); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₂₀₃H₃₀₀N₃₀O₁₇ 7541.4894, found: *m/z* 7563.4 [M+Na]⁺.

RK-αMan₁₆ (19). Compound **19** (7.7 mg, 73%) was obtained by following the oxime ligation procedure described for **9**. Analytical HPLC: *R*_f: 8.4 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); semi-preparative HPLC: *R*_f: 13.6 min (gradient: 5 to 40% B in 30 min); ¹H NMR resonance assignments are given in Table 2; MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₂₀₃H₃₀₀N₃₀O₁₇ 7541.4894, found: *m/z* 7563.7 [M+Na]⁺.

RK-βLac₁₆ (20). Compound **20** (10.0 mg, 82%) was obtained by following the oxime ligation procedure described for **9**. Analytical HPLC: *R*_f: 8.0 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); semi-preparative HPLC: *R*_f: 11.2 min (gradient: 5 to 40% B in 30 min); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.91–7.79 (m, 20 H, 20xH_{ox}), 5.27–5.22 (m, 16 H, 16xH1), 4.76–4.74 (m, 8 H, 4xCH₂O), 4.52 (d, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 7.7 Hz, 16xH1), 4.47–4.26 (m, 28 H, 28xH₄), 4.07–3.96 (m, 34 H, 16xH6, 16xH4, 2xH₅), 3.93–3.75 (m, 118 H, 16xH3, 16xH4, 16xH5, 16xH5, 16xH6, 32xH6, 2xH₅, 2xCH₂), 3.73 (dd, 16 H, ²*J*_{H₃H₂} = 3.2 Hz, ²*J*_{H₃H₄} = 10.0 Hz, 16xH3), 3.68–3.59 (m, 32 H, 16xH2, 16xH2), 3.37–3.24 (m, 40 H, 20xCH₂), 2.36–1.27 (m, 146 H); MALDI-TOF-MS (positive

linear mode); calcd average mass for $C_{30}H_{46}N_2O_{14}$ 10135.7678, found: m/z 10156.9 [M+Na]⁺.

RR- α TF₁₆ (21). Compound **21** (6.0 mg, 69%) was obtained by following the oxime ligation procedure described for **9**. Analytical HPLC: R_f = 7.9 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); semi-preparative HPLC: R_f : 12.0 min (gradient: 5 to 40% B in 30 min); ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7.80–7.76 (m, 20 H, 20 \times H₁₆), 5.62–5.59 (m, 16 H, 16 \times H¹), 4.73–4.69 (m, 8 H, 4 \times CH₂O), 4.56 (td, 16 H, ³J_{1,2} = 3.8, ³J_{2,3} = 11.5 Hz, 16 \times H²), 4.51 (d, 16 H, ³J_{1,2} = 7.6 Hz, 16 \times H¹), 4.41–4.22 (m, 44 H, 16 \times H⁴, 28 \times H₁₆), 4.15–4.07 (m, 18 H, 16 \times H³, 2 \times H₁₆), 4.02 (bt, 16 H, ¹J_{3,4} = 6.0 Hz, 16 \times H⁵), 3.93 (bd, 16 H, ¹J_{2,3} = 3.0 Hz, 16 \times H⁴), 3.83–3.62 (m, 102 H, 16 \times H³, 16 \times H⁵, 32 \times H⁶, 32 \times H^{6'}, 2 \times H₁₆, 2 \times CH₂OH), 3.58–3.52 (m, 16 H, 16 \times H²), 3.33–3.18 (m, 40 H, 20 \times CH₂OH), 2.36–1.27 (m, 194H); MALDI-TOF-MS (positive linear mode); calcd average mass for $C_{34}H_{60}N_2O_{14}$ 10792.6088, found: m/z 10836.5 [M+2Na]⁺.

NMR spectroscopy

Peptide samples were dissolved in a mixture of 95% H₂O/5% D₂O to a final concentration of 2–3 mM at 25 °C. A set of two-dimensional (2D) spectra, including TOCSY,⁴⁰ DQF-COSY⁴¹ and NOESY⁴² were acquired with 1.5 s steady state recovery time, mixing times (t_m) of 60 ms for TOCSY and 250 ms for NOESY. Water suppression was achieved by appending an excitation-sculpting module⁴³ to the non-selective detection pulse and with selective Gaussian-shaped pulses of 3–5 ms. The spin-lock mixing of the TOCSY experiment was obtained with a DIPSI-2⁴⁴ pulse train at $\gamma B_1/2\pi$ = 9–10 kHz. The acquisitions were performed over a spectral width of 10 ppm in both dimensions, with a matrix size of 2048 data points in t_2 and 256–512 points in t_1 , and 32–64 scans/ t_1 . All spectra were referenced with external TSP-d4. Data processing and analysis were performed using Felix software (version 2001, Accelrys, San Diego, CA, USA) with shifted (60–90 degrees) square sinebell apodization and polynomial baseline correction for NOESY data.

Distance restraints and molecular modelling

Approximate interproton distance restraints were calculated using the isolated two-spin approximation relationship, $r_{ij} = r_{ik} (\sigma_{ij}/\sigma_{ik})^{1/\alpha}$, where σ_{ij} and σ_{ik} are the NOE intensities for the atom pairs i, j and k, l separated by distances r_{ij} and r_{ik} , respectively. A total of 17 distance restraints were used for compound **19** and 4 for compound **10**. Restrained energy minimizations were performed with the software Insight II/Discover (Version 2005, Accelrys, San Diego, CA, USA), using the set of distance restraints determined by NMR. The selected force field was CVFF, and, to shorten the range of Coulomb interaction, a distance-dependent relative dielectric constant, ϵ_r , was used ($\epsilon_r = 4r$). The structure was subjected to 2500 iterations of steepest descent minimization, followed by 2500 iterations of conjugate gradient minimization and the convergence of minimization was followed until the RMS derivative was less than 0.01 kcal mol⁻¹.

MALDI-TOF experiments

Mass spectra were acquired for all RAFT conjugates in a MALDI-TOF/TOF UltraFlex III mass spectrometer equipped with a nitro-

gen laser (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) using an external calibration of Protein Mixture 2 standard (Bruker-Daltonics, Germany). A 50 mg mL⁻¹ solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) in 50% CH₃CN/0.1% CF₃COOH was used as the MALDI matrix and a 1.0 μ L of pre-treated sample dissolved in water was, after drying, overlaid with 0.5 μ L of the matrix solution on the target. The MALDI-TOF positive spectra were collected in linear mode. Every sample before mass spectrometric analysis was diluted in 20 μ L 0.1% CF₃COOH and pre-treated in an OligoR3 (Applied Biosystems, CA, USA) reverse phase microcolumn. The prepared OligoR3 microcolumn (in Eppendorf gel-loader tips) was regenerated with 100 μ L 80% CH₃CN, 0.1% CF₃COOH, washed with 100 μ L 0.1% CF₃COOH, and after loading 20 μ L of sample, washed again with 50 μ L 0.1% CF₃COOH, 100 μ L 100 mM CH₃COONH₄ (pH 8.1), and 50 μ L 0.1% CF₃COOH. To elute a sample, 40 μ L of 80% CH₃CN, 0.1% CF₃COOH was used, dried in a Speed-Vac, dissolved in 7 μ L of deionized water and loaded onto the MALDI target.

Enzyme-linked lectin assay (ELLA)

96-well microtiter plates (Nunc, MaxiSorp, Vienna, Austria) were coated with polymeric α -D-mannose (PAA- α Man, 100 μ L per well, diluted from a stock solution of 5 μ g mL⁻¹ in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 0.1 mM Ca²⁺ and 0.1 mM Mn²⁺ for 1 h at 37 °C. The wells were then washed with PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (T-PBS, 3 \times 100 μ L per well). The washing procedure was repeated after each incubation throughout the assay. The wells were then blocked with BSA in PBS (3% w/v, 100 μ L per well) at 37 °C for 1 h. After washing, the wells were filled with 100 μ L of serial dilutions of peroxidase-labelled concanavalin A (ConA-HRP) from 10⁻¹–10⁻⁷ mg mL⁻¹ in 0.01 M PBS (pH 7.4) containing 0.1 mM Ca²⁺, 0.1 mM Mn²⁺ and BSA (0.3% w/v) and incubated at 37 °C for 1 h. The plates were washed with T-PBS (3 \times 100 μ L per well) then the colour was developed using 100 μ L per well of 0.05 M phosphate-citrate buffer containing *O*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, 0.4 mg mL⁻¹) and urea hydrogen peroxide (0.4 mg mL⁻¹). The reaction was stopped after 10 min by adding H₂SO₄ (30% v/v, 50 μ L per well) and the absorbance was measured at 490 nm in each well. Blank wells contained citrate-phosphate buffer. The concentration of ConA-HRP conjugate that read absorbance between 0.8 and 1 was used for inhibition experiments.

Inhibition experiments

The microtiter plates were coated with PAA- α Man as described previously. Each inhibitor was added in serial two-fold dilutions (60 μ L per well) in PBS with ConA-HRP (60 μ L) at the desired concentration on Nunclon (Delta) microtiter plates and incubated for 1 h at 37 °C. The above solutions (100 μ L) were then transferred to the mannose-polymer-coated microplates, which were incubated for 1 h at 37 °C. The plates were washed with T-PBS and the OPD substrate was added (100 μ L per well). Colour development was stopped after 10 min and the absorbances were measured using a microtiter plate reader. The percentage inhibition was plotted against the logarithm of the concentration of the sugar derivatives. A sigmoidal curve was fitted and the concentration at 50% inhibition of binding of the ConA to

polymeric mannose-coated microtiter plate wells was determined (IC_{50}). The percentages of inhibition were calculated as given in eqn 1, where A = absorbance.

$$\% \text{ inhibition} = (A_{(\text{free mannose})} - A_{(\text{mannose-coated})}) / A_{(\text{free mannose})} \times 100 \quad (1)$$

The IC_{50} values obtained from several independently performed tests were in the range of $\pm 17\%$. Nevertheless, the relative inhibition values calculated from independent series of data were highly reproducible.

Acknowledgements

This work was supported by Université Joseph Fourier, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and EU ESF COST Chemistry project D34. We thank the NanoBio Program for access to the facilities of the Chemistry Platform. Further, this work was supported by grants LC06010 and MSM21620808 from the Ministry of Education of the Czech Republic, 305/09/H008 from the Czech Science Foundation, and by an Institutional Research Concept for the Institute of Microbiology (AVOZ50200510).

Notes and references

- (a) H. J. Gabius, (Ed), *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009; (b) M. Ambrosi, N. R. Cameron and B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 1593–1608; (c) C. R. Bertozzi and L. L. Kiessling, *Science*, 2001, **291**, 2357–2354; (d) D. H. Dube and C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2005, **4**, 477–488.
- (a) Y. C. Lee and R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 321–327; (b) M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2754–2794; (c) J. J. Lundquist and E. J. Toone, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 555–578; (d) T. K. Dam and C. F. Brewer, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 387–429.
- (a) Y. M. Chabre and R. Roy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2010, **63**, 165–393; (b) A. Imberty, Y. M. Chabre and R. Roy, *Chem.-Eur. J.*, 2006, **14**, 7490–7499; (c) K. J. Doores, D. O. Gambin and B. G. Davis, *Chem.-Eur. J.*, 2006, **12**, 656–665.
- (a) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Panu, R. J. Read and D. R. Bundle, *Nature*, 2000, **403**, 669–672; (b) M. Touaibia, A. Wellens, T. C. Shiao, Q. Wang, S. Sirois, J. Bouckaert and R. Roy, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 1190–1201 c).
- (a) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oeljen and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14922–14933; (b) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 2348–2368; (c) R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2013–2025; (d) N. Rockendorf and T. K. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.*, 2001, **217**, 201–238.
- For recent reviews, see: (a) V. Ladmiral, E. Melia and D. M. Haddleton, *Eur. Polym. J.*, 2004, **40**, 431–449; (b) B. Voit and D. Appelhans, *Macromol. Chem. Phys.*, 2010, **211**, 727–735.
- (a) K. Křenek, M. Kaldová, K. Hulíková, I. Štibor, P. Lhoták, M. Dudík, J. Budka, H. Pelantová, K. Bozouška, A. Fišerová and V. Křen, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 1781–1792; for recent reviews, see: (b) L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone and R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 254–266; (c) A. Dondoni and A. Marra, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 4949–4977.
- For a recent review, see: D. A. Fulton and J. F. Stoddart, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 655–672.
- For recent reviews, see: (a) P. Niederhafner, J. Šebestík and J. Ježek, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 3–43; (b) P. Niederhafner, J. Šebestík and J. Ježek, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 44–65.
- For recent reviews, see: (a) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2003, **15**, 291–310; (b) M. J. Cloninger, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, **6**, 742–748.
- O. Renaudet, *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2008, **5**, 274–286.
- For selected references, see: (a) K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada and K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 357–358; (b) C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Joehum, Y. Chevolot, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur and F. Morvan, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 4700–4702; (c) K. Gorska, K.-T. Huang, O. Chaloin and N. Winssinger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 7695–7700.
- J.-F. Nierengarten, J. Jehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Iliescas, A. Munoz, N. Marin, J. Rojo, M. Sanchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka and S. P. Vincent, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3860–3862.
- For selected reviews, see: (a) J. M. de la Fuente and S. Penades, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2006, **1760**, 636–651; (b) M. Marradi, M. Martin-Lomas and S. Penades, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2010, **64**, 211–290.
- (a) D. Boturyn, E. Defranceq, G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Labbé, O. Renaudet and P. Dumy, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 224–240; (b) O. Renaudet, J. Garcia, D. Boturyn, N. Spinelli, E. Defranceq, P. Labbé and P. Dumy, *Int. J. Nanotechnol.*, 2010, **7**, 738–752.
- O. Renaudet and P. Dumy, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 243–245.
- V. Duléry, O. Renaudet, M. Wilczewski, A. Van der Heyden, P. Labbé and P. Dumy, *J. Comb. Chem.*, 2008, **10**, 368–371.
- (a) O. Renaudet, G. Dasgupta, I. Bettahi, A. Shi, A. B. Nesburn, P. Dumy and L. BenMohamed, *PLoS One*, 2010, **5**, e11216; (b) O. Renaudet, K. Křenek, I. Bossu, P. Dumy, A. Kádek, D. Adámek, O. Vaněk, D. Kavan, R. Gažák, M. Šuk, K. Bezouška and V. Křen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6800–6805; (c) O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi and P. Dumy, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 737–741; (d) I. Bettahi, G. Dasgupta, O. Renaudet, A. A. Chentoufi, X. Zhang, D. Carpenter, S. Yoon, P. Dumy and L. BenMohamed, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, **58**, 187–200; (e) S. Grigulevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc and P. Dumy, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **5**, 1149–1159.
- (a) N. Dendane, A. Houng, O. Renaudet, F. Vinet, P. Dumy and E. Defranceq, *Lab Chip*, 2008, **8**, 2161–2163; (b) M.-P. Dubois, C. Gondran, O. Renaudet, P. Dumy, H. Driguez, S. Fort and S. Cosnier, *Chem. Commun.*, 2005, 4318–4320; (c) M. Wilczewski, A. Van der Heyden, O. Renaudet, P. Dumy, L. Coche-Guarente and P. Labbé, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1114–1122.
- W. B. Turnbull and J. F. Stoddart, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2002, **90**, 231–255.
- (a) H. C. Hang and C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 727–736; (b) K. Lu, Q.-P. Duan, L. Ma and D.-X. Zhao, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 187–202.
- (a) F. Peri and F. Nicotra, *Chem. Commun.*, 2004, 623–627; (b) J. M. Langenhan and J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.*, 2005, **2**, 59–81.
- (a) F. Peri, P. Dumy and M. Mutter, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 12269–12278; (b) J. M. Langenhan, N. R. Peters, I. A. Guzei, F. M. Hoffmann and J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 12305–12310; (c) A. V. Gudmundsdottir, C. E. Paul and M. Nitz, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 278–284.
- S. Cao, F. D. Tropper and R. Roy, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 6679–6686.
- For selected references, see: (a) E. C. Rodriguez, L. A. Marciaurelle and C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 7134–7135; (b) L. A. Marciaurelle, Y. Shin, S. Guon and C. R. Bertozzi, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 3691–3694; (c) X. Chen, G. S. Lee, A. Zeitl and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 6112–6116; (d) P. R. Andreason, W. Xie, H. N. Cheng, L. Qiao, D. J. Murphy, Q.-M. Gu and P. G. Wang, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 1863–1866; (e) O. Renaudet and P. Dumy, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 2127–2135; (f) O. Renaudet and P. Dumy, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 5383–5386; (g) O. Renaudet and J.-L. Reymond, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 4693–4696; (h) J. Tejler, H. Löffler and U. J. Nilsson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 2343–2345; (i) H. Brunner, M. Schönherr and M. Zabel, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 1115–1122; (j) D. Lagnoux, T. Darbre, M. Lienhard Schmitz and J.-L. Reymond, *Chem.-Eur. J.*, 2005, **11**, 3941–3950.
- O. Renaudet and P. Dumy, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 7575–7578.
- O. Renaudet and P. Dumy, *Open Glycoscience*, 2008, **1**, 1–7.
- O. Renaudet and P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 2628–2636.
- O. Renaudet and P. Dumy, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 65–68.
- Y. Singh, O. Renaudet, E. Defranceq and P. Dumy, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 1359–1362.
- K. F. Geoghegan and J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.*, 1992, **3**, 138–146.
- V. Duléry, O. Renaudet and P. Dumy, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 11952–11958.
- (a) J. Kalia and R. T. Raines, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 7523–7526; (b) N. Spinelli, O. P. Edupuganti, E. Defranceq and P. Dumy, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 219–222.
- E. K. Woller and M. J. Cloninger, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 1052–1054.

- 35 K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, New York, (1986).
- 36 N. Nazarpak-Kandlousy, I. V. Chernushevich, L. J. Meng, Y. Yang and A. V. Elisei, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3358–3366.
- 37 Y. Mechref and M. V. Novotny, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 321–369.
- 38 D. Pagé, D. Zanini and R. Roy, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, **4**, 1949–1961.
- 39 (a) T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, M. Herz, R. Haubner, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger and H.-J. Wester, *Radiochim. Acta*, 2004, **92**, 317–327; (b) E. H. Nardin, J. M. Calvo-Calle, G. A. Oliveira, P. Chavijo, R. Nussenzweig, R. Simon, W. Zeng and K. Rose, *Farctine*, 1998, **16**, 590–600.
- 40 L. Brunschweiler and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1983, **53**, 521–528.
- 41 U. Piantini, O. W. Sorensen and R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 6800–6801.
- 42 J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1979, **71**, 4546–4553.
- 43 T. L. Hwang and A. J. Shaka, *J. Magn. Reson., Ser. A*, 1995, **112**, 275–279.
- 44 A. J. Shaka, C. J. Lee and A. Pines, *J. Magn. Reson.*, 1988, **77**, 274–293.

Chapitre 2 :
Etude des propriétés
biologiques des
glycoclusters

III. Etude des propriétés biologiques des glycoclusters

Les lectines sont des protéines capables de reconnaître spécifiquement des sucres sous forme monomérique ou oligomérique. Elles sont classées suivant leur origine qui peut être végétale, animale ou encore bactérienne. Les CBPs (= Carbohydrate Binding Proteins) jouent un rôle prépondérant dans de nombreux processus biologiques de reconnaissance. Elles sont impliquées dans la clairance du système circulatoire, l'adhésion d'agents infectieux sur les cellules hôtes que nous détaillerons plus loin dans ce manuscrit, les interactions cellules-cellules dans le système immunitaire, ou encore dans la migration des métastases. Dans la classe des lectines animales, certaines présentent un rôle biologique remarquable. Par exemple, les galectines jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire. Elles se trouvent en général dans le cytoplasme des cellules mais également dans le noyau. Plus rarement, elles peuvent être observées à la surface cellulaire. Parmi la quinzaine de galectines référencées à ce jour, les Gal-1 et Gal-3 sont par exemple impliquées respectivement dans le développement cellulaire normal et la différenciation des cellules et dans l'adhésion des cellules cancéreuses pour le développement de métastases. D'autres lectines de type C telles que les Sélectines présentent un rôle biologique particulier. Les sélectines E, P et L sont des protéines spécifiques de la plupart des sucres sialylés et sont respectivement insérées à la surface des cellules de l'endothélium, des leucocytes (plaquettes) et des lymphocytes. Elles interviennent notamment lors de mécanismes inflammatoires ou de défense contre un agent pathogène.

Nous avons étudié les interactions qui pourraient exister entre nos conjugués multivalents et différentes lectines que nous avons sélectionnées suivant leur substrat et leur intérêt biologique. Cette étude d'interaction lectine-sucre s'est plus particulièrement focalisée sur la lectine bactérienne PA-IIL provenant de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Trois autres lectines ont été choisies afin d'évaluer l'efficacité de nos ligands : la lectine légumineuse *Concanavalin A* (ConA) spécifique du D-mannose, la lectine végétale *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) spécifique du L-fucose et les galectines spécifiques du lactose et des *N*-lactosamine ou *N*-galactosamine impliquée dans la propagation métastatique de certains cancers. L'activité biologique de nos glycoconjugués a été évaluée principalement par deux tests : le test Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) et le test d'inhibition d'hémagglutination (HIA).

III.1. Evaluation biologique des glycoclusters vis-à-vis de différentes lectines

III.1.1. Tests biologiques réalisés

a. Test ELLA

Le test ELLA¹³² (Figure 87) est une méthode couramment utilisée pour évaluer le pouvoir d'un ligand naturel ou synthétique à inhiber l'interaction entre une lectine et un substrat de référence. Ce test est réalisé sur microplaques à 96 puits. La première étape consiste à recouvrir les puits généralement avec un polymère glycosylé. Différentes concentrations en inhibiteurs sont testées en présence de la lectine biotinylée qui interagit avec la surface. La visualisation de l'interaction s'effectue avec une streptavidine couplée à une enzyme peroxydase qui catalyse la formation d'un composé coloré à partir d'un substrat commercial. Ce test présente l'avantage d'être simple à réaliser et fournit des informations fiables sur les propriétés de reconnaissance de ligands.

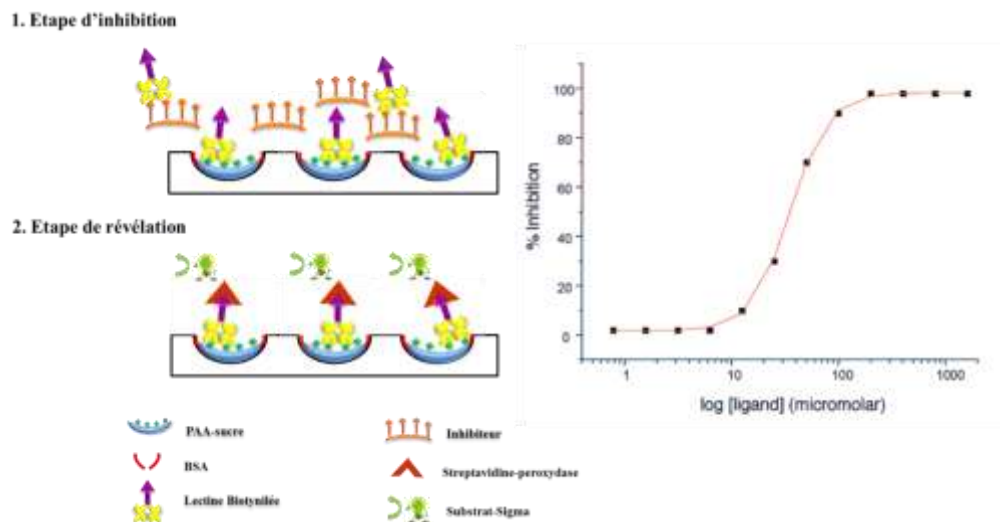


Figure 87. Principe du test ELLA et exemple d'une courbe d'inhibition

Les données obtenues permettent de tracer une courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur. On peut ainsi déterminer une valeur d'IC₅₀ qui indique la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'interaction entre le ligand immobilisé et la lectine. Cette donnée permet de calculer le potentiel relatif de

¹³² J. P. McCoy, J. Varany, I. J. Goldstein, *Anal. Biochem.* **1983**, 130, 437-444.

l'inhibiteur (*rp* pour « relative potency ») qui représente l'amélioration apportée par rapport au monosaccharide de référence. Enfin, lorsque cette dernière valeur est rapportée au nombre de sucre *n* dans la molécule, on obtient une valeur de potentiel relatif par sucre (*rp/n*) qui permet d'évaluer le gain réel apporté par la présentation multiple de sucre. Cette valeur s'apparente au facteur β défini par Whitesides¹² qui représente le rapport entre la constante d'affinité du ligand multivalent sur celle du ligand monovalent. Un effet de multivalence est généralement admis à partir d'une valeur *rp/n* supérieure à 1.

b. Test d'inhibition d'hémagglutination

Ce test (Figure 88) réalisé sur microplaque est basé sur la propriété qu'ont les lectines à se lier de manière multivalente aux sucres présents à la surface des érythrocytes. Le pontage des cellules par la lectine conduit à une agglutination visible à l'œil nu. Cette hémagglutination peut être entièrement inhibée par un ligand compétiteur spécifique de la lectine étudiée¹³³. La concentration minimale de ce ligand définit son potentiel d'inhibition. La première étape consiste à déterminer le « point d'équivalence » c'est-à-dire la concentration minimale en lectine pour laquelle une hémagglutination est encore nettement visible. Cette concentration définit une unité d'hémagglutination (UH). Le test est réalisé en présence d'une concentration de 4 UH en lectine. La première étape est une incubation du ligand à des concentrations variables en présence de la lectine puis l'introduction des érythrocytes. Ce test également facile à mettre en œuvre permet d'évaluer « à l'œil » de façon comparative plusieurs ligands.

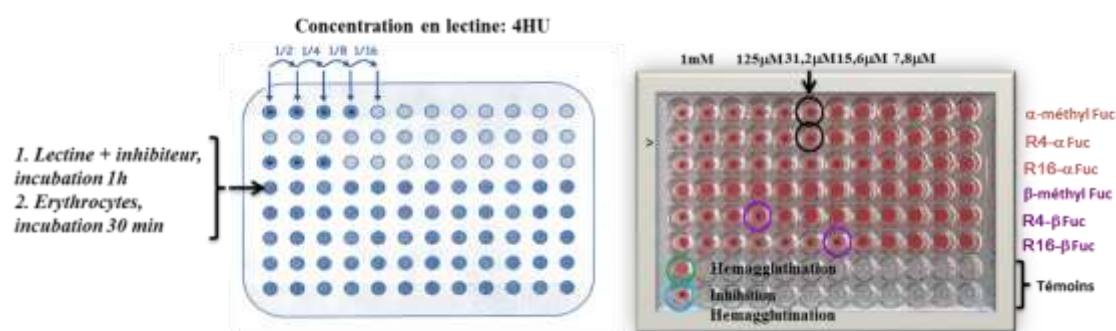


Figure 88. Principe et exemple du test d'inhibition d'hémagglutination

¹³³ E. P. Mitchell, C. Sabin, L. Snajdrova, M. Porkona, S. Perret, C. Gautier, C. Hofr, N. Gilboa-Garber, J. Koca, M. Wimmerova, A. Imberty, *Proteins* **2005**, 56, 735-746.

III.1.2. Interaction des dérivés mannosylés avec la lectine ConA

a. Structure de la lectine Con A

La ConA est une lectine légumineuse issue des haricots Jack très étudiée depuis de nombreuses années, principalement en raison de son faible coût. Elle présente une affinité pour le mannose modérée (mM) et est également capable d'interagir avec le glucose avec des affinités plus faibles. La protéine se présente sous forme tétramérique à pH neutre présentant quatre sous-unités dans une orientation tétraédrique. Les sites d'interaction avec les unités glycosidiques sont séparés de l'ordre de 72 Å¹³⁴ (Figure 89).



Figure 89. Structure cristalline de la Con A

b. Exemples d'inhibiteurs de la lectine Con A

De nombreux composés multivalents ont été développés afin d'étudier les interactions avec la ConA (Figure 90). En particulier, l'équipe de R. Roy a décrit la synthèse de composés mannosylés divalents qui se sont avérés, lors de l'étude par tests ELLA, avoir une efficacité par sucre 19 fois supérieure à celle du monomère mannose de référence (allyl- α -D-mannopyranoside)¹³⁵. De manière similaire, d'autres glycoclusters de petite taille ont été développés à partir d'un métal de coordination. Evalué par le test HIA, un complexe de ruthénium lié à six mannoses a montré un potentiel inhibiteur par sucre 37 fois supérieur au monomère de référence¹³⁶. L'équipe de L. L. Kiessling¹³⁷ a également décrit la synthèse de ligands plus volumineux tels que les polymères mannosylés. L'évaluation de ces composés par des tests HIA a montré des résultats intéressants pour l'inhibition de la ConA, notamment

¹³⁴ P. N. Kanellopoulos, K. Pavlou, A. Perrakis, B. Agianan, C. E. Vorgias, C. Mavrommatis, M. Soufi, P. A. Tucker, S. J. Hamodrakas, *J. Struct. Biol.* **1996**, *116*, 345-355.

¹³⁵ R. Roy, D. Pagé, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1765-1770.

¹³⁶ T. Hasegawa, T. Yonemura, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 728-737.

¹³⁷ M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932.

que l'affinité du ligand pour la lectine augmente significativement lorsque la longueur du polymère augmente. D'autres inhibiteurs de taille importante ont pu être développés à partir de dendrimères PAMAM présentant un nombre croissant de mannose. Les tests HIA ont montré une efficacité par sucre 600 fois supérieure à celle du monomère¹³⁸. Des systèmes hybrides de haute densité à base de nanoparticules d'or¹³⁹ ont permis d'identifier un composé de 20 nm de diamètre, possédant 680 mannoses à sa surface, ayant une efficacité inhibitrice par sucre 100 fois supérieure à celle du monomère.

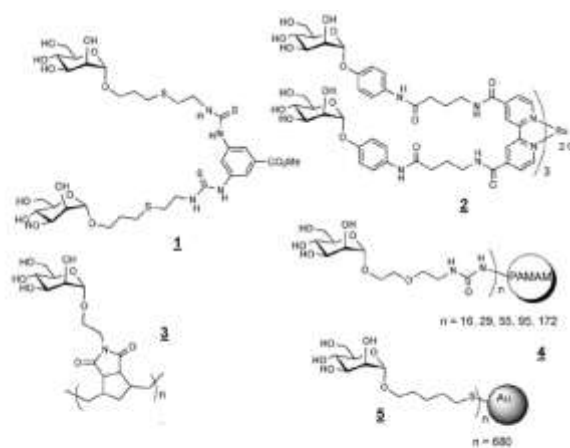


Figure 90. Exemples de structures d'inhibiteurs de la Con A ; 1. Dendrimère divalent de l'équipe de R. Roy, 2. Complexe de Rutherford glycosylé de l'équipe de K. Kobayashi, 3. Polymère mannosylé de L. L. Kiessling 4. Dendrimère de M. J. Cloninger 5. Nanoparticules d'or de C. C. Chen.

Ces glycoconjugués présentent dans certains cas des problèmes de solubilisation ainsi qu'une chimie difficilement contrôlable. Nos composés mannosylés dont la structure est parfaitement définie et possédant une distribution spatiale différente de ces composés ont été évalués avec la lectine ConA.

¹³⁸ E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8820-8826.

¹³⁹ C. C. Lin, Y. C. Yeh, C. Y. Yang, G. F. Chen, Y. C. Chen, Y. C. Wu, C. C. Chen, *Chem. Commun.* **2003**, 2920-2921.

c. Résultats des études biologiques

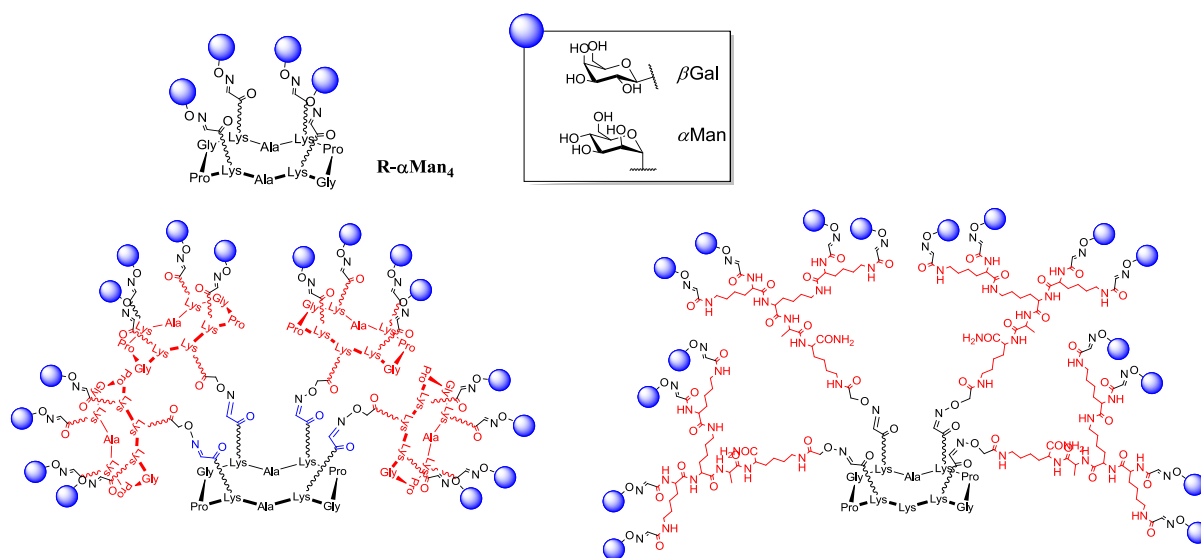


Figure 91. Structures testées avec la lectine ConA

| Composés | n ^[a] | IC ₅₀ [μM] ^[b] | Pot.rel. ^[c] | Pot.rel./sucre ^[d] |
|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| αManOMe | 1 | 199 | 1.0 | 1.0 |
| R-αMan ₄ 46b | 4 | 58 | 3.4 | 0.8 |
| RR-αMan ₁₆ 64b | 16 | 3.6 | 55.3 | 3.4 |
| RD-αMan ₁₆ 63b | 16 | 0.7 | 284 | 17.7 |
| RR-βGal ₁₆ 64a | 16 | Pas d'inhibition | - | - |

Tableau 1 : [a] Nombre de sucres dans le ligand. [b] Moyenne des trois expériences indépendantes; [c] Potentiel Relatif = IC₅₀ (monomère correspondant à la famille de sucre) / IC₅₀ (inhibiteur); [d] Potentiel Relatif/sucre = potentiel relatif/n.

Une première série de tests ELLA a été réalisée afin d'étudier l'influence de la valence et de la structure des molécules représentées sur la Figure 91 sur l'adhésion de la lectine sur un polymère de référence. Le composé R-αMan₄ présente un IC₅₀ modeste (58 μM) même s'il reste meilleur que le monomère de référence, l'αManOMe (Tableau 1). Le *rp/n* indique une efficacité comparable au monomère de référence, ce qui signifie que le gain apporté n'est pas dû à un effet de multivalence mais simplement à un effet de concentration (ou effet statistique). Cependant, les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les composés hexadécavalents RR-αMan₁₆ et RD-αMan₁₆ (3.6 et 0.7 μM respectivement) montrent une inhibition plus marquée de la lectine. En effet, les *rp/n* indiquent clairement le bénéfice apporté par la présentation multiple des sucres, en particulier pour la structure RD-αMan₁₆ qui est environ 18 fois

meilleure que le monomère. Cet effet est probablement dû au plus haut degré de liberté que semble apporter le linker polylysine dans cette structure qui doit certainement favoriser une meilleure présentation des sucres à la lectine. Il faut enfin noter l'absence d'inhibition dans le cas du composé RR- β Gal₁₆ ce qui confirme qu'aucune interaction non spécifique n'a lieu avec le squelette peptidique lui-même. Les résultats obtenus peuvent donc être attribués aux résidus mannosylés présents dans les molécules¹⁴⁰.

III.1.3. Interaction des dérivés fucosylés avec la lectine UEA-I

a. Structure de la lectine UEA-I

La lectine UEA-I¹⁴¹ est une lectine légumineuse qui se présente sous forme dimérique. Elle est spécifique de l'antigène sanguin H (ou O). Elle est également capable de reconnaître le fucose avec une constante de l'ordre du millimolaire. La distance entre les deux sites d'interaction du dimère est de 69 Å (Figure 92).

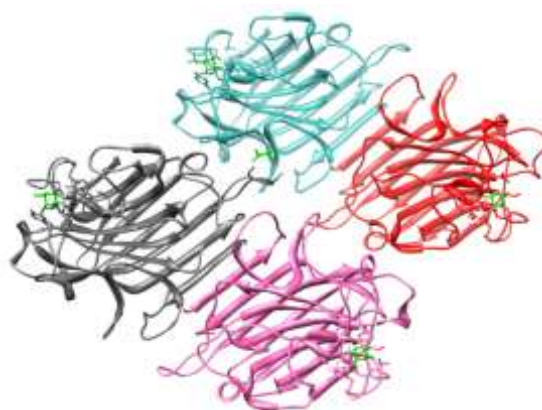


Figure 92. Structure cristalline de la lectine UEA-I en présence d' α -L-Fuc-OMe

b. Exemples d'inhibiteurs de la lectine UEA-I

A ce jour, très peu de ligands multivalents synthétiques capables d'inhiber l'interaction de cette lectine ont été décrits dans la littérature. L'équipe de J. -L. Reymond a testé une bibliothèque combinatoire de 15 625 glycopeptides décorés par des résidus fucosylés en position N-terminale selon un protocole de criblage sur bille de résine. Ces ligands présentent

¹⁴⁰ I. Bossu, M. Šulc, K. Křenek, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, P. Dumy, V. Křen, O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 1948-1959.

¹⁴¹ G. F. Audette, M. Vondonselaar, L. T. J. Delbaere, *J. Mol. Biol.* **2000**, 304, 423-433.

quatre résidus fucoses par dendrimères¹⁴². Ces composés sélectionnés à l'issue du criblage ont été resynthés puis évalués par tests ELLA. En particulier, le composé FD2 (Figure 93) présente une inhibition intéressante ($IC_{50} = 11 \mu M$) avec un rp de 115 par rapport au L-Fucose et un rp/n de 29. Cette molécule semble donc induire un effet de multivalence que les auteurs ont attribué à la séquence en acides aminés présents sur le bras porteurs des unités fucoses. Il pourrait en effet exister des interactions secondaires entre le squelette peptidique et le site d'interaction.

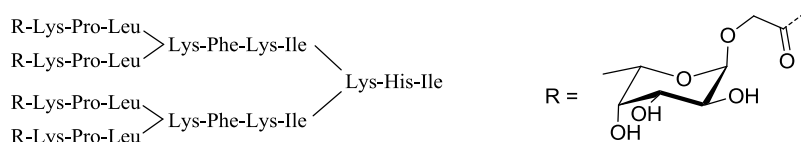


Figure 93. Structure de FD2, inhibiteur de l'UEA-I

c. Résultats des tests biologiques

Nous avons choisi de tester l'influence de la nature du lien oxime ou triazole de nos molécules tétravalentes fucosylées sur l'interaction de la lectine UEA-1 (Figure x).

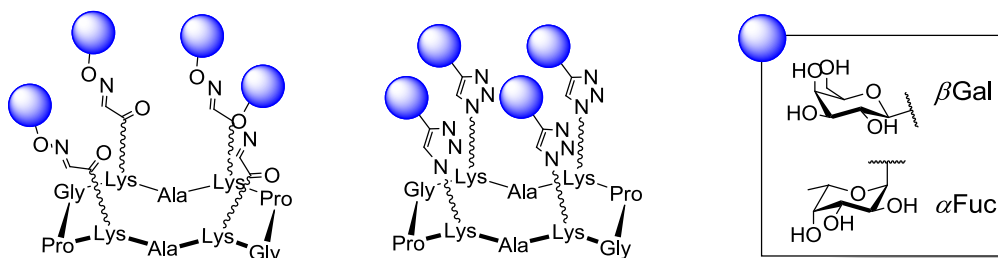


Figure 94. Structures testées avec la lectine UEA-I

¹⁴² E. Kolomiets, E. Johansson, O. Renaudet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1465-1468.

| Composés | n ^[a] | IC ₅₀ [μ M] ^[b] | Pot.rel. ^[c] | Pot.rel./sucre ^[d] |
|---|------------------|--|-------------------------|-------------------------------|
| α -L-Fuc-OMe | 1 | 103 \pm 8 | 1 | 1 |
| R- β Gal ₄ 46a | 4 | Pas d'inhibition | - | - |
| R- α Fuc ₄ 46b | 4 | 1 \pm 0.2 | 102.6 | 25.7 |
| R _{trz} - β Gal ₄ 86a | 4 | Pas d'inhibition | - | - |
| R _{trz} - α Fuc ₄ 86c | 4 | 16 \pm 2 | 6.4 | 1.6 |

Tableau 2 : [a] Nombre de sucres dans le ligand. [b] Moyenne des trois expériences indépendantes; [c] Potentiel Relatif = IC₅₀ (monomère correspondant à la famille de sucre) / IC₅₀ (inhibiteur); [d] Potentiel Relatif/sucre = potentiel relatif/n.

Les résultats indiqués dans le tableau 2 montrent une nette différence d'activité entre les glycoconjugués comportant un lien triazole ou oxime. En effet, le composé tétravalent R_{trz}- α Fuc₄ présente une inhibition modeste de la lectine (IC₅₀ = 16 μ M) alors que le composé R- α Fuc₄ présente un effet d'inhibition important (IC₅₀ = 1 μ M). Cette molécule est donc 100 fois plus efficace que le monomère correspondant (α -L-Fuc-OMe) pour inhiber l'interaction de UEA-1 sur le polymère immobilisé. Le potentiel relatif par sucre rp/n est d'environ 26 pour le conjugué R- α Fuc₄ alors qu'il n'est que de 1,6 pour R_{trz}- α Fuc₄ ce qui indique clairement un effet de multivalence significatif qui peut être attribué au lien chimiosélectif employé pour la conjugaison de nos molécules. On peut en effet supposer que l'orientation spatiale du sucre est plus favorable que dans le cas du lien oxime. Il est cependant exclu d'envisager des interactions non spécifiques dues au squelette peptidique puisqu'aucune inhibition n'est observée avec le composé R- β Gal₄. D'après la structure cristalline de la lectine, les distances entre les sites d'interaction sont largement supérieures à la distance maximale entre deux unités saccharidiques dans nos molécules (de l'ordre de 30 Å). L'effet d'inhibition observé pour la molécule R- α Fuc₄ ne peut donc pas être dû à l'interaction simultanée de plusieurs sucres sur la même lectine mais plus certainement à un effet d'aggrégation ou un effet statistique.¹⁴³

¹⁴³ I. Bossu, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, *J. Carbohydrate Chem.* **2011**, 30, 458-468.

III.1.4. Interactions des glycoconjugués avec les galectines

a. Présentation des galectines 3 et 4

Dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de H. J. Gabius, nous avons testé une série de dérivés tétravalents et hétéradécavalents avec différentes lectines spécifiques de β -galactosides. Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, les galectines sont des lectines d'origine animale présentes dans divers tissus sains ou pathogènes. Ces lectines, spécifiques de structures présentant une unité β -galactose terminale (lactose ou *N*-lactosamine par exemple) sont impliquées dans de nombreuses fonctions aussi bien à l'intérieur et qu'à l'extérieur de la cellule. Parmi cette famille de lectines, la galectine Gal-3 est l'une des lectines de cette famille la plus étudiée. Elle est biologiquement active sous forme oligomérique¹⁴⁴. Il a été montré qu'un taux élevé de cette protéine dans le milieu extracellulaire autour de la tumeur pouvait favoriser la migration des métastases. La galectine Gal-4 est constituée de deux domaines de reconnaissance reliés par une chaîne peptidique. Une surexpression de Gal-4 est induite dans divers cancers¹⁴⁵. Le développement d'inhibiteurs efficaces capables d'interagir avec ces galectines pourrait constituer une voie thérapeutique intéressante pour empêcher la progression tumorale et ainsi contribuer à l'élaboration d'une nouvelle stratégie anti-cancéreuse.

Les glycoconjugués ayant une architecture de cœur de type RK présentant des résidus galactose, lactose ou de l'antigène TF ont été évalués par un test sur microplaque comme inhibiteurs de Gal-3 et Gal-4. Deux autres protéines, les lectines végétales à galactose, la lectine de l'arachide *Arachis hypogaea* (peanut) agglutinin (PNA) et la toxine végétale *Viscum album* L. agglutinin (VAA) ont également été testées. Les résultats des tests d'inhibition sont présentés dans le tableau ci-dessous.

¹⁴⁴ R. Y. Yang, G. A. Rabinovich, F. T. Liu *Expert Rev Mol Med.* **2008**, *13*, 17-39.

¹⁴⁵ M. E. Huflejt, H. Leffler, *J. Glycoconj.* **2004**, *20*, 247-55.

b. Résultats des tests biologiques

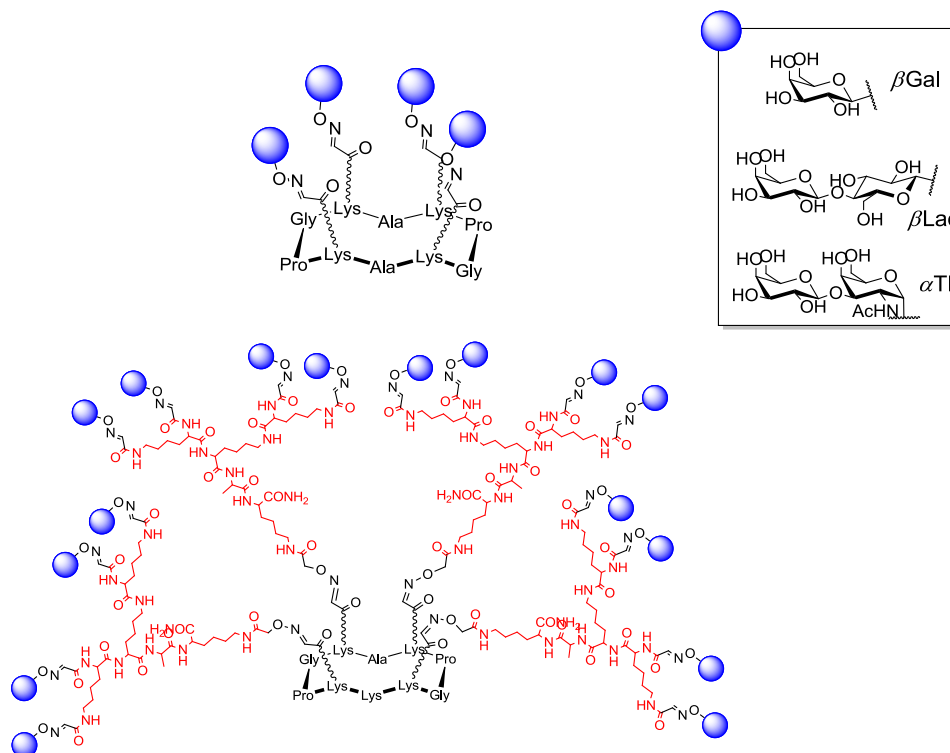


Figure 95. Structure des candidats inhibiteurs des galectines 3 et 4

| Inhibiteur | VAA | PNA | Gal-3 | Gal-4 |
|--|------|------|-------|-------|
| β Galactose | 3.5 | 2 | 44 | 32 |
| β Lactose | 2 | 0.4 | 0.8 | 3.0 |
| R-βGal₄ 46a | 0.3 | 1 | 4 | 4 |
| R-βLac₄ 46e | 0.75 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| R-αTF₄ 46f | 1 | 0.03 | 0.4 | 1.0 |
| RD-βGal₁₆ 63a | 0.02 | 1 | 4 | 4 |
| RD-βLac₁₆ 63c | 0.2 | 0.5 | 0.25 | 0.03 |
| RD-αTF₁₆ 63d | 1.0 | 0.03 | 0.3 | 0.125 |

Tableau 3 : Valeurs d' IC_{50} (en mM) envers les différentes lectines et galectines

Ces tests d'inhibition nous ont tout d'abord permis de mettre en évidence que les glycopeptides inhibent ces quatre lectines spécifiquement, avec une efficacité variable suivant les sucres présentés (Tableau 3). Pour l'agglutinine VAA, le meilleur inhibiteur est le

composé RD- β Gal₁₆ qui présente un IC₅₀ de 0.02 mM. L'augmentation du nombre de sucre de quatre à seize apporte un gain d'affinité modeste de 15, ce qui ne permet pas de conclure à un réel effet de multivalence. En revanche, les meilleurs inhibiteurs sont les composés tétravalent R- α TF₄ et hexadécavalents RD- α TF₁₆ (IC₅₀=0.03 mM) dans le cas de la PNA. Ceci montre clairement que l'augmentation du nombre de sucre n'est pas suffisante pour améliorer l'affinité d'un composé. Pour les deux galectines, on peut noter que nos inhibiteurs sont très peu efficaces dans le cas de la galectine Gal-3. En revanche, le composé RD- α Lac₁₆ présente un IC₅₀ plus efficace (0.03 mM) que la molécule tétravalente (0.25 mM) avec la galectine Gal-4¹⁴⁶.

III.1.5. Interaction des glycoclusters avec la lectine bactérienne PA-III

a. La bactérie Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste Gram-négative que l'on trouve principalement au niveau des sols ainsi que dans l'eau douce ou salée. Cette bactérie est inoffensive pour les personnes saines mais est responsable de nombreuses infections parfois mortelles, en particulier chez les sujets immunodéficients ou atteints de fibrose kystique. Comme de nombreuses bactéries, elle présente une forte résistance au traitement par des antibiotiques classiques. Le pouvoir hautement pathogène de cette bactérie est lié d'une part à sa facilité à adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte, et d'autre part à la formation d'un biofilm d'alginate qui favorise le développement de la bactérie et la protéger contre l'action des traitements médicamenteux (Figure 96). Il est désormais admis que ces deux événements sont causés par la production de deux lectines solubles, la PA-IL (LecA) et PA-IIL (LecB).

¹⁴⁶ S. André, O. Renaudet, I. Bossu, P. Dumy, H.-J. Gabius, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 427-437.

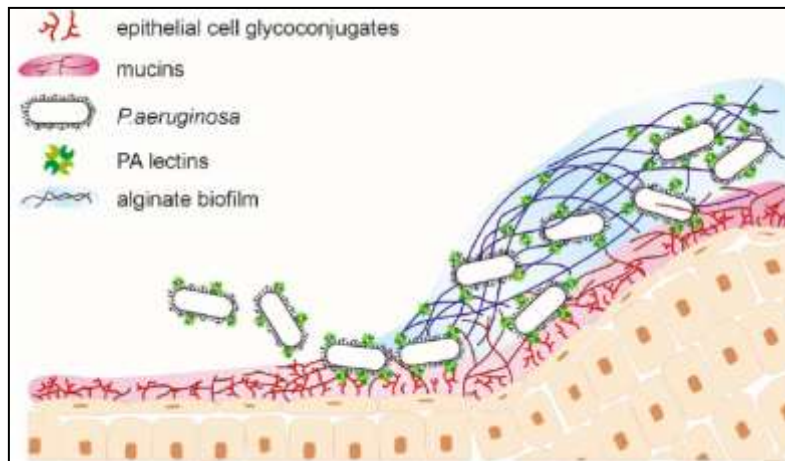
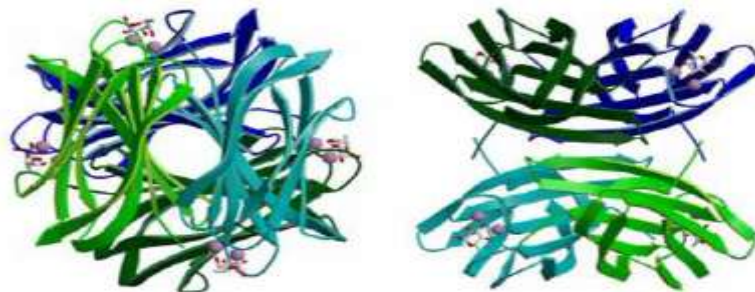


Figure 96. Formation du biofilm de *P. aeruginosa*

Comme nous l'avons mentionné en introduction, les glycoclusters présentent une alternative de choix à l'utilisation d'antibiotiques pour prévenir ou traiter les désordres induits par cette bactérie. Pour notre part, nous nous sommes particulièrement intéressés à la lectine PA-III¹⁴⁷ qui a constitué la cible biologique du réseau de collaboration européen COST dans lequel nous avons été impliqués.

b. Présentation de la lectine PA-III

La lectine PA-III se présente sous la forme d'un tétramère, dont les quatre monomères sont constitués de neuf brins β anti-parallèles¹⁴⁸. Elle présente une affinité inhabituellement forte pour un monosaccharide, puisque la constante d'association (K_a) du α -L-Fucose est de $1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Figure 97).



¹⁴⁷ D. Tielker, S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau, K. E. Jaeger, *Microbiology* **2005**, *151*, 1313-1323.

¹⁴⁸ N. Garber, U. Guempel, N. Gilboa-Garber, R. J. Doyle, *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *48*, 331-334.

Figure 97. Structure tridimensionnelle de la PA-IIL complexée par le α -L-Fucose¹⁴⁹

Elle est également capable de reconnaître d'autres sucres avec une moindre affinité qu'on peut classer dans cet ordre : β -L-Fucose>L-Galactose>D-arabinose> D-Fructose> D-Mannose.

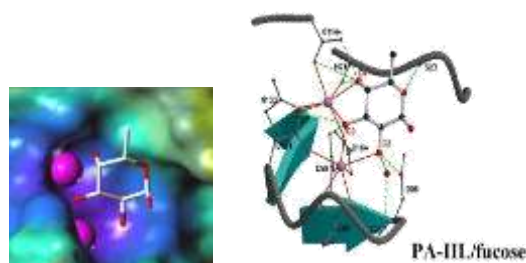


Figure 98. Structure du site de reconnaissance de la PA-IIL en présence de α -L-fucose

La structure du site d'interaction de la PA-IIL (Figure 98) a été déterminée par diffraction aux rayons X par l'équipe d'A. Imberty. Elle montre la présence de deux ions calcium qui forment des liaisons de coordination avec les oxygènes des hydroxyles 2, 3 et 4 du monomère. La position anomérique du L-fucose demeure libre et n'intervient pas dans l'interaction avec le monomère.

c. Exemples d'inhibiteurs de la lectine PA-IIL

Contrairement à la lectine PA-IL qui a été l'objet de nombreuses études¹⁵⁰, peu des structures multivalentes ont été testés avec la lectine PA-IIL. L'équipe de R. Roy a préparé une série de dendrimères de petite taille, fonctionnalisés soit par des ligands fucose ou galactose ou les deux¹⁵¹ (Figure 99a). Des tests de turbidimétrie ont montré que ces composés précipitent rapidement en présence de la lectine en raison de phénomènes d'agrégation (cross-linking). Par contre, aucun effet de multivalence notable n'a été mis en évidence. Ces mêmes auteurs ont développé une seconde génération de ligands greffés par des disaccharides α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc¹⁵². L'activité de ces composés évaluée par tests ELLA et ITC n'a pas

¹⁴⁹ E. Mitchell, C. Houles, D. Sudakevitz, M. Wimmerova, C. Gautier, S. Pérez, A. M. Wu, N. Gilboa-Garber, A. Imberty, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 918-921.

¹⁵⁰ S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerova, J. P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 2146-2159.

¹⁵¹ I. Deguise, D. Lagnoux, R. Roy, *New J. Chem.* **2007**, 31, 1321-1331.

¹⁵² K. Marotte, C. Prévaille, C. Sabin, M. Moumé-Pymbock, A. Imberty, R. Roy, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2953-2961.

montré d'effet de multivalence même si ces composés tendent à ici encore à provoquer l'agrégation puis la précipitation de la molécule.

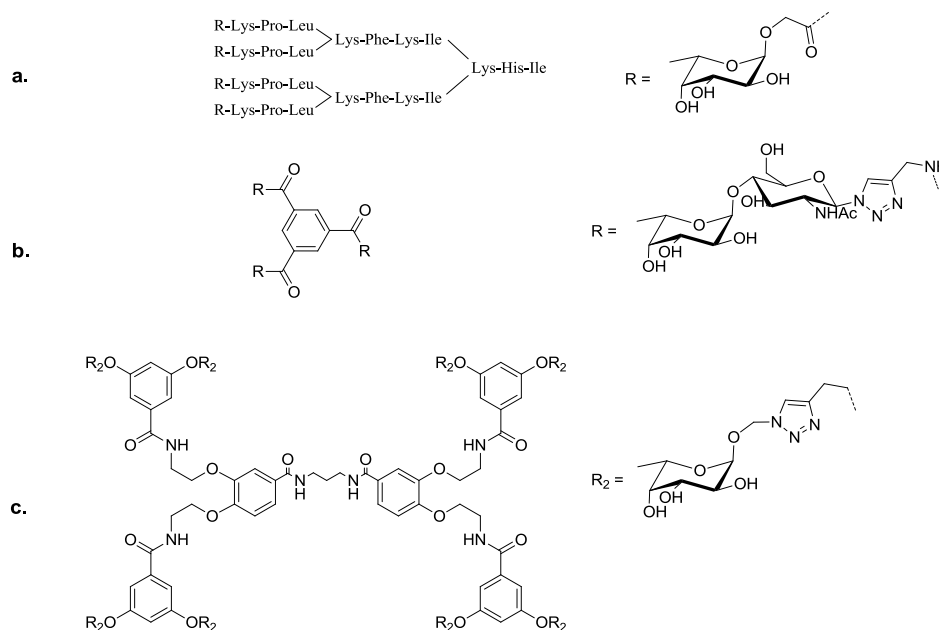


Figure 99. Structure des candidats inhibiteurs de la PA-IIL

En revanche, le groupe de J.-L. Reymond a identifié un excellent ligand de cette lectine à partir de la bibliothèque de composés dont nous avons parlé précédemment. Ce ligand tétravalent (Figure 99c) possède non seulement un IC_{50} de $0.14 \mu M$, mais s'avère aussi très efficace pour prévenir la formation du biofilm bactérien¹⁵³. Des études structurales ont permis de mettre en évidence que ces effets sont dus à au cluster de sucre mais également à des interactions secondaires du squelette peptidique à proximité du site de reconnaissance.

d. Résultats des tests biologiques

i. Tests ELLA

Nous avons évalué sur cette lectine PA-IIL les propriétés d'inhibition de nos glyoclusters tétravalents, hexavalents et hexadécavalents décorés par les motifs α -L-Fucose, β -L-Fucose, β -D-Galactose et α -D-Mannose (Figure 100). Les résultats des tests ELLA obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

¹⁵³ E. M. V. Johansson, S. A. Cruz, E. Kolomiets, L. Buts, R. U. Kadam, M. Cacciarini, K. M. Bartels, S. P. Diggle, M. Camara, P. Williams, R. Loris, C. Nativi, F. Rosenau, K. E. Jaeger, T. Darbre, J. L. Reymond, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1249-1257.

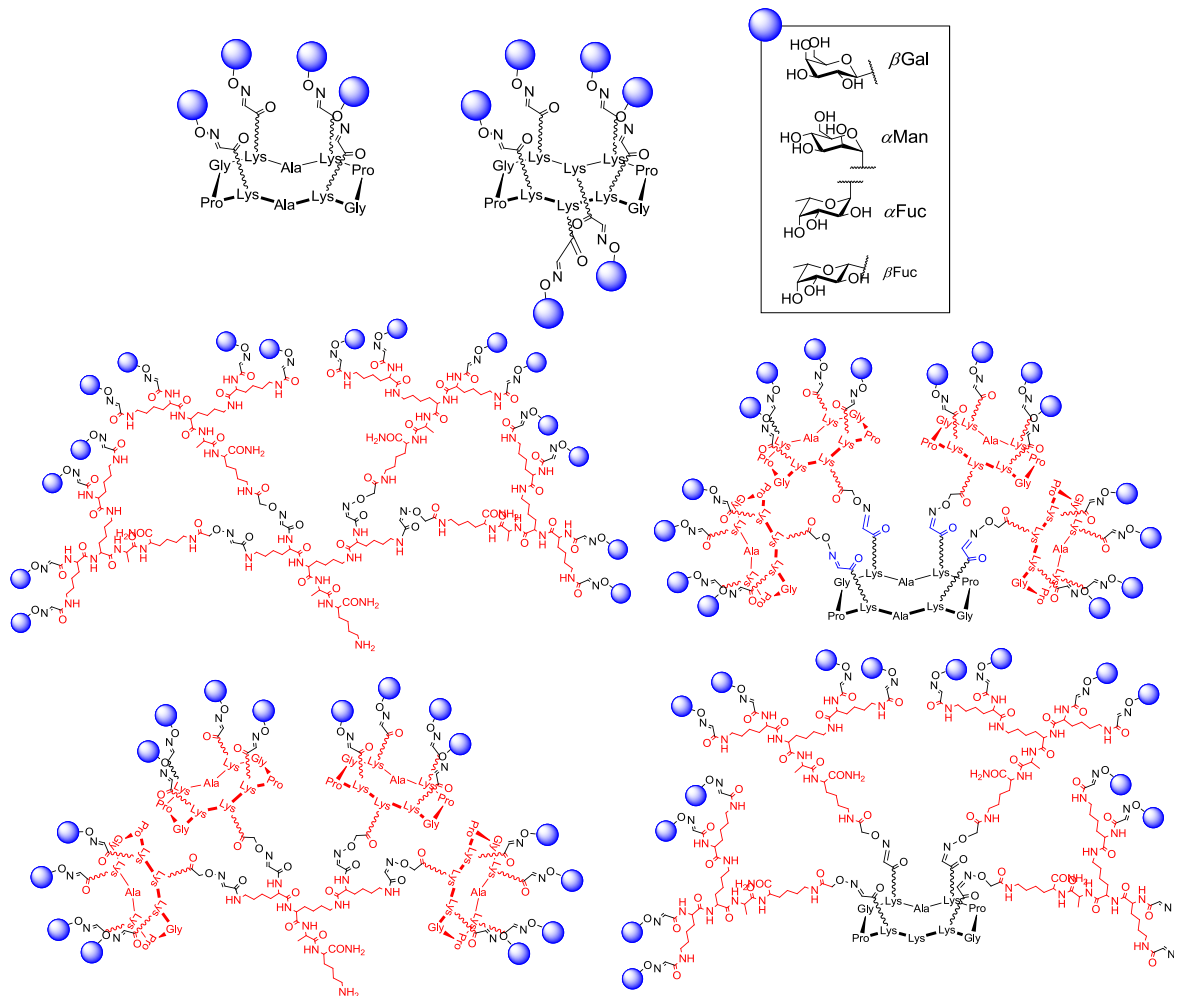


Figure 100. Structures testées avec la lectine PA-III

| Composés | n ^[a] | IC ₅₀ (μM) ^[b] | | Rel.Pot. ^[c] | Rel. Pot. / sugar ^[d] |
|----------------------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------------|
| α-L-Fuc-OMe | 1 | 0,62 | ± 0,03 | 1 | 1 |
| R-αFuc ₄ 46c | 4 | 0,145 | ± 0,05 | 4,3 | 1 |
| R-αFuc ₆ 50c | 6 | 0,15 | ± 0,03 | 4,1 | 0,7 |
| RD-αFuc₁₆ 63e | 16 | 0,0006 | ± 0,0001 | 1033 | 64,6 |
| RR-αFuc ₁₆ 64e | 16 | 0,011 | ± 0,008 | 56,3 | 3,5 |
| DD-αFuc ₁₆ 67c | 16 | 0,0076 | ± 0,001 | 81 | 5 |
| DR-αFuc ₁₆ 68c | 16 | 0,0092 | ±0,001 | 67 | 4 |
| <hr/> | | | | | |
| β-L-Fuc-OMe | 1 | 70 | ± 11 | 1 | 1 |
| R-βFuc ₄ 46d | 4 | 3,79 | ± 0,7 | 18,5 | 4,6 |
| R-βFuc ₆ 50d | 6 | 1,25 | ± 1 | 56 | 9,3 |
| RD-βFuc ₁₆ 63f | 16 | 0,109 | ± 0,002 | 514 | 40 |
| RR-βFuc ₁₆ 64f | 16 | 0,10 | ± 0,08 | 680 | 42 |
| DD-βFuc ₁₆ 67d | 16 | 0,071 | ± 0,009 | 986 | 61,6 |
| DR-βFuc₁₆ 68d | 16 | 0,051 | ± 0,006 | 1372 | 85,8 |
| <hr/> | | | | | |
| α-D-ManOMe | 1 | 77,6 | | 1 | 1 |
| R-βMan ₄ 46b | 4 | 40,73 | | 1,7 | 0,5 |
| R-βMan ₆ 50b | 6 | 13,8 | | 5 | 0,9 |
| RD-βMan₁₆ 63b | 16 | 1,14 | ± 0,1 | 68 | 4,2 |
| RR-βMan ₁₆ 64b | 16 | 1,5 | ±0,1 | 46,6 | 3,2 |
| DD-βMan ₁₆ 67b | 16 | 1,6 | | 48 | 3 |
| DR-βMan ₁₆ 68b | 1 | 11,5 | | 46,6 | 3,2 |
| <hr/> | | | | | |
| β-D-Gal | | N.D. | | | |
| R-βGal ₄ 46a | 4 | N.D. | | | |
| RD-βGal ₁₆ 63a | 16 | N.D. | | | |
| RR-βGal ₁₆ 64a | 16 | N.D. | | | |
| DD-βGal ₁₆ 67a | 16 | N.D. | | | |
| DR-βGal ₁₆ 68a | 16 | N.D. | | | |

Tableau 3 : [a] Nombre de sucres dans le ligand. [b] Moyenne des trois expériences indépendantes; [c] Potentiel Relatif = IC₅₀ (monomère correspondant à la famille de sucre) / IC₅₀ (inhibiteur); [d] Potentiel Relatif/sucre = potentiel relatif/n. [e] « N.D. » = Pas d'inhibition détectable

Les données de ce test (Tableau 3) nous permettent de tirer différentes conclusions quant à l'influence de la valence, de la nature du lien anomérique ou encore de l'architecture du ligand sur leur potentiel d'interaction avec la lectine.

➤ *Influence de la valence*

Dans les cas des glycoclusters tétra et hexavalents α -fucosylés, on peut remarquer que dans toutes les séries, l'augmentation du nombre de sucre n'apporte aucune amélioration significative (rp/n de l'ordre de 1). Il est en effet connu que la distance minimale qui sépare deux sites de reconnaissance du tétramère de la lectine B est d'environ 40Å. Nous pouvons affirmer que les bras espaceurs des lysines ne sont pas suffisamment long (20Å environ entre les sucres) dans ces deux familles de composés pour venir ponter directement deux sites au sein du même tétramère, la possibilité d'un effet chélate est donc exclue. Le faible effet observé dans ces deux cas est donc certainement dû à un effet d'aggrégation de la protéine (cross-linking). En revanche, la série de molécules hexadécavalentes présente des potentiels d'inhibition bien plus intéressants puisqu'ils sont tous de l'ordre du nanomolaire: RR- α Fuc₁₆ (IC₅₀ = 11 nM), DD- α Fuc₁₆ (IC₅₀ = 7,6 nM), DR- α Fuc₁₆ (IC₅₀ = 9,2 nM). L'effet cluster le plus significatif est observé avec le composé RD- α Fuc₁₆ qui inhibe l'adhésion de cette lectine à une concentration subnanomolaire (IC₅₀ = 0,6 nM). Les valeurs de rp et rp/n sont dans ce cas de 1033 et 65 respectivement (en rouge dans le tableau), ce qui représente le meilleur inhibiteur connu à ce jour pour cette lectine.

Dans la série β -fucosylée, les glycoconjugués tétravalent R- β Fuc₄ et hexavalent R- β Fuc₆ présentent un potentiel d'inhibition intéressant (IC₅₀ = 3,8 et 1,2 μ M respectivement) soit 20 à 60 fois supérieur à celui du monosaccharide β -L-Fuc-OMe. Comme dans la série α -fucosylée, la série hexadécavalente apporte une bien meilleure efficacité avec des IC₅₀ en dessous du μ M. Le meilleur effet d'inhibition est cependant obtenu dans cette série avec le composé DR- β Fuc₁₆ (IC₅₀ = 0,051 μ M), correspondant à un rp remarquable de plus de 1300 (en bleu dans le tableau). Dans ces deux séries de glycoconjugués α ou β -glycosylés, une augmentation du potentiel inhibiteur en corrélation avec l'augmentation de la valence des molécules, en particulier avec les composés hexadécavalents, a clairement été mis en évidence.

Enfin, dans la série mannosylée, le potentiel inhibiteur des composés tétravalent et hexavalent sont médiocres. Dans la série hexadécavalente, les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont de l'ordre du µM. Le *rp/n* montre dans tous les cas des valeurs proches de 1, ce qui indique qu'aucun effet de multivalence n'est observé dans la série mannosylée. Le composé ayant la meilleur potentiel d'inhibition dans cette série est le RD-βMan₁₆ (IC₅₀= 1,14 µM) (en vert dans la tableau). Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la lectine ne présente qu'une faible affinité pour le D-mannose. Notons enfin que la série galactose a été testée comme témoin négatif. L'absence d'inhibition confirme que le squelette peptidique n'est pas impliqué dans l'inhibition de la lectine.

➤ *Effet de la nature du lien anomérique.*

La lectine PA-IIL présente une nette préférence pour l'anomère de configuration α. Ceci est confirmé par les résultats du test ELLA. A degré de valence identique, les glycoconjugués de configuration α-fucose possèdent un IC₅₀ bien meilleur que ceux de la série β, notamment pour le dérivé RD-αFuc₁₆. Nous nous attendions en effet à cette tendance puisque le monomère α-L-Fuc-OMe est 113 fois plus efficace que le monomère β-L-Fuc-OMe. En revanche, lorsqu'on regarde les valeurs de *rp* rapportée au β-L-Fuc-OMe de référence en série β-fucose, on note que l'une molécule exerce un effet de multivalence bien plus fort (*rp* = 1372) que ne le laisse supposer sa valeur d'IC₅₀ (0.05 µM). Ce résultat est très intéressant puisqu'il montre que même si le sucre n'est pas présenté sur la molécule avec la « bonne » configuration, un effet de synergie important peut néanmoins être observé s'il est présenté de manière adéquate à la protéine. En d'autres termes, la différence d'efficacité entre les deux séries de glycoconjugués pourrait s'expliquer par une disposition plus favorable du résidu glycosidique dans la configuration β plutôt qu'en configuration α. On peut parler d'un « effet d'orientation ».

➤ *Influence de la structure des glycoclusters hexadécavalents*

Les résultats observés pour les séries de composés hexadécavalents montrent clairement que la structure de la plateforme peptidique influence leur potentiel d'inhibition. En effet, sur les quatre molécules testées en série α et β fucose, respectivement un (RD, *rp* = 1033) et deux (DD, *rp* = 986 et DR, *rp* = 1372) composés montrent une forte amélioration des effets

d'inhibition. Ces données indiquent que l'inhibition observée n'est pas seulement à une simple aggrégation comme c'est le cas dans avec les autres composés de ces série, mais pourrait également être l'effet d'une chélation (ou « aggregative chelate »). Cette hypothèse semble plausible puisque la distance estimée entre les deux unités fucoses les plus éloignées est d'environ 60Å (contre seulement 20Å pour le composé tétravalents) alors que les sites de reconnaissance entre chaque monomère de cette lectine sont distants d'environ 40-50Å. Malheureusement, les expériences de titration par microcalorimétrie donnant accès aux paramètres thermodynamiques et la stoechiométrie de l'interaction ont donné des résultats difficilement interprétables en raison de problèmes de précipitation. L'ensemble de ces résultats montre néanmoins clairement que le nombre ou la nature du sucre ne sont pas les seuls facteurs influençant l'interaction, mais que la géométrie du ligand est essentielle pour assurer une interaction efficace. La flexibilité des ligands semble également être un paramètre important en série α -fucose. En effet, le système RD comportant des bras lysines relativement flexibles greffés sur une base contrainte et rigide semble la plus favorable au contraire des autres structures plus contraintes (RR) ou plus flexibles (DD).

ii. Tests d'inhibition d'héماغglutination

| Composés | n ^[a] | Concentration minimale [μ M] ^[b] | rp | rp/n |
|---|------------------|--|------|------|
| α -L-Fuc-OMe | 1 | 25 | 1 | 1 |
| R- α Fuc ₄ 46c | 4 | 25 | 1 | 0,25 |
| RD-αFuc₁₆ 63e | 16 | 6,25 | 0,25 | 0,01 |
| RR- α Fuc ₁₆ 64e | 16 | 12,5 | 0,5 | 0,03 |
| <hr/> | | | | |
| β -L-Fuc-OMe | 1 | N.D. ^[c] | | |
| R- β Fuc ₄ 46d | 4 | 500 | | |
| RD- β Fuc ₁₆ 63f | 16 | 12,5 | | |
| RR- β Fuc ₁₆ 64f | 16 | 25 | | |

Tableau 4: Valeurs d'inhibition observées par tests d'héماغglutination [a] Nombre de sucres dans le ligand. [b] Moyenne des trois expériences indépendantes; [c] « N.D. » = Pas d'inhibition détectable

Pour confirmer les effets observés lors des tests ELLA, nous avons réalisé des tests HIA avec les séries de molécule fucosylées (Tableau 4). Parmi les glycoconjugués, portant 16 résidus α -fucoses, seules les structures RD- α Fuc₁₆ ont été étudiées, les meilleurs résultats au niveau des tests ELLA ayant été obtenu avec le composé possédant cette architecture et le sucre de

configuration α . Ce test réalisé en présence des monosaccharides de référence a montré une fois de plus une affinité beaucoup plus forte de la PA-III pour l'anomère α -Fucose comparé à l'anomère β , comme nous l'attendions. Nos inhibiteurs ont quant à eux montré les mêmes tendances que celle observées lors des tests ELLA bien que les résultats soient beaucoup moins spectaculaires. En effet, dans les deux séries de glycoconjugués testés, les composés tétravalents ont montré une efficacité comparable à celle des monomères correspondants, les composés hexadécavalents étant les plus efficaces. L'effet d'inhibition le plus net a été observé en série β anomérique avec le composé RD. En série α , il n'a pas été possible de confirmer le fort effet d'inhibition qui avait été observé par ELLA avec le composé RD- α Fuc₁₆. Ceci peut s'expliquer par le fait que les concentrations auxquelles l'inhibition de l'hémagglutination est observée sont beaucoup plus fortes. De plus, le format de ces tests ELLA (un polymère de référence est immobilisé sur une microplaque) et HIA (tous les partenaires en solution, le partenaire de référence étant une érythrocyte) peut également expliquer de telles différences. Ce genre d'effet a d'ailleurs déjà été rapportées dans la littérature.

III.2. Propriétés immunologiques

En collaboration avec l'équipe du Pr. Vladimir Kren, nous avons synthétisé des composés multivalents polyfonctionnels dans le but de développer des molécules capables d'induire une réponse immunitaire de la part des cellules NK contre des cellules tumorales.

III.2.1. Les cellules NK

Les cellules NK (= Natural Killer) sont des lymphocytes effecteurs de l'immunité innée. Elles sont capables d'éliminer des cellules tumorales ou infectées sans immunisation préalable^{154,155}. Leur activité est régulée par un processus complexe lié à des récepteurs activateurs et/ou inhibiteurs de la fonction lytique (figure 101). Lorsqu'une cellule NK rencontre une autre cellule étrangère, la lyse ne se produira que si les signaux d'activation, généralement des polysaccharides exprimés sur la cellule la cible, dépassent les signaux d'inhibition. En revanche, lorsque les cellules NK rencontrent une tumeur, la réponse immunitaire est fortement atténuée en raison de la présence de molécules du complexe majeur

¹⁵⁴ E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walter, S. Ugolini, *Nature Immunol.* **2008**, 9, 503-510.

¹⁵⁵ J. P. Santo, *Nature Immunol.* **2008**, 9, 473-475.

d'histocompatibilité (MHC 1) qui inhibent le signal *via* le récepteur d'inhibition. Il a toutefois été montré que des ligands synthétiques des récepteurs d'activation pouvaient permettre la lyse efficace de cellules tumorales.

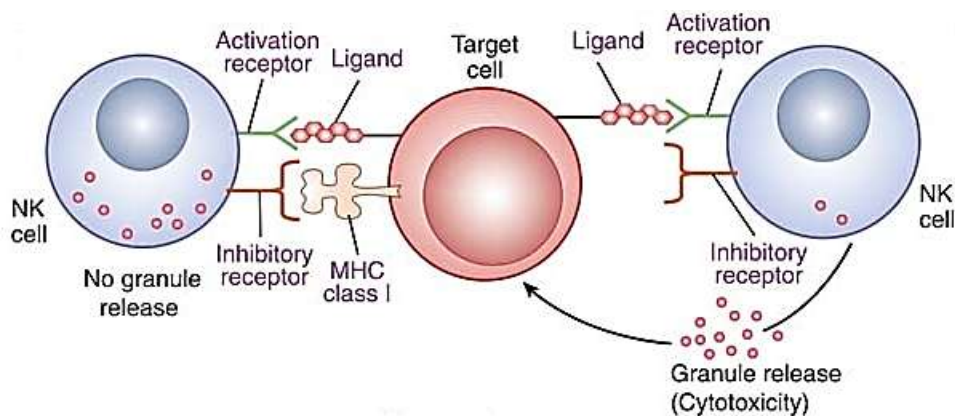


Figure 101. Fonctionnement de la cellule NK

Les principaux récepteurs activateurs ou inhibiteurs des cellules NK appartiennent à deux familles qui sont les immunoglobulines et les lectines de type C. Ces lectines reconnaissent des sucres mais également des peptides. Dans cette famille, le récepteur NKR-P1A des cellules NK chez les rongeurs a été largement étudié^{156,157}. Ce récepteur activateur possède une spécificité pour les monosaccharides *N*-acétylés tels que ManNAc, GlcNAc ou GalNAc et avec certaines séquences particulières d'oligosaccharides. Chez l'homme, le récepteur CD69 a été identifié comme un récepteur activateur des lymphocytes bien que non spécifique des cellules NK. Ce récepteur présente une réactivité vis-à-vis des sucres comparables à NKR-P1A et ainsi que des séquences oligosaccharidiques contenant des fonctions carboxyles ou sulfates. Des études récentes ont pu mettre en évidence qu'un peptide provenant de la protéine de choc thermique hsp65, le pentapeptide de séquence LELTE¹⁵⁸ pouvait se lier sous une forme dimérique au récepteur CD69 et l'activer de manière efficace¹⁵⁹.

Nous avons donc synthétisé des molécules comportant ces différents motifs sucre et peptide pour évaluer leur propriétés d'activation des cellules NK.

¹⁵⁶ R. Giorda, W. A. Rupert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt, M. Trucco, *Science* **1990**, 249, 1298-1300.

¹⁵⁷ J. C. Ryan, E. C. Niemi, R. D. Goldfien, J. C. Hiserodt, W. S. Seaman, *J. Immunol.* **1991**, 147, 3244-3250.

¹⁵⁸ K. Bezouška, J. Pavlíček, B. Sopko, V. Křen, A. Fišerova, M. Pospíšil, P. Novak, V. Havlíček, *Scand. J. Immunol.* **2001**, 54, 26.

¹⁵⁹ K. Bezouška, D. Kavan, H. Mrazek, D. Manglova, P. Bašova, V. Křen, *FEBS J.* **2008**, 275, 81.

III.2.2. Exemples de candidats immunomodulateurs

Très peu d'études comparables ont été réalisées avec des ligands multivalents sur ces cellules. Les principaux travaux rapportés ont été réalisés par l'équipe du Pr V. Křen qui a testé une famille de calixarènes carboxylés ou glycosylés. Certaines structures se sont avérées capable d'interagir efficacement avec le récepteur CD69 (Figure 102). Les résultats obtenus ont en effet montré que ces composés se lient efficacement avec le récepteur cible avec un K_d de 10^{-10} M pour le meilleur candidat B^{160,161}. De plus, certains composés glycosylés se sont montrés efficaces pour activer la lyse cellulaire.

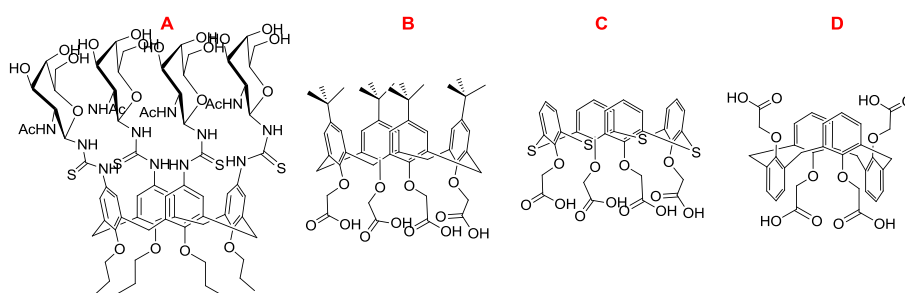


Figure 102. Structures des calixarènes glycosylés et carboxylés

III.2.3. Résultats des tests biologiques

a. Rappel des structures testées

Dans ce contexte, nous avons synthétisé des glycoclusters polyfonctionnels comportant deux ou quatre copies du peptide LELTE et deux ou quatre α GalNAc orientés de part et d'autre de notre plateforme peptidique (Figure 103)¹⁶².

¹⁶⁰ K. Bezouška, R. Snajdrova, K. Křenek, M. Vancurova, A. Kadek, D. Adamek, P. Lhotak, D. Kavan, K. Hofbauerova, P. Man, P. Bojarova, V. Křen, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1434-1440.

¹⁶¹ A. Drozdová, P. Bojarová, K. Křenek, L. Weignerová, B. Henßen, L. Elling, H. Christensen, H. H. Jensen, H. Pelantová, M. Kuzma, K. Bezouška, M. Krupová, D. Adánek, K. Slámová, V. Křen, *Carbohydrate Res.* **2011**, *346*, 1599-1609.

¹⁶² O. Renaudet, K. Křenek, I. Bossu, P. Dumy, A. Kadek, D. Adamek, O. Vanek, D. Kavan, R. Gazak, M. Sulc, K. Bezouška, V. Křen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6800-6808.

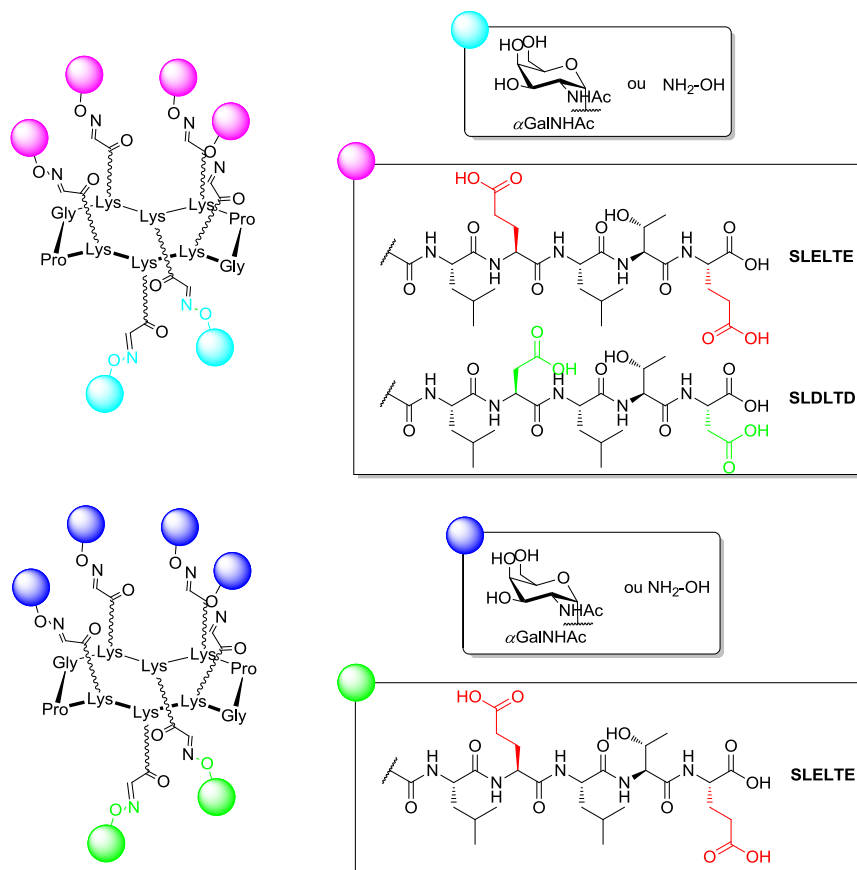


Figure 103. Rappel des structures testées

b. Résultats des études biologiques

✓ Tests d'affinité vis-à-vis des récepteurs NKR-P1A et CD69

Des tests d'inhibition de type ELISA ont été menés avec nos glycoconjugués sur des récepteurs NKR-P1A de rat et le récepteur CD69 humains par l'équipe du Pr V. Kren. Le ligand immobilisé sur les plaques de microtitration est le $\text{GlcNAc}_{23}\text{BSA}$, pour lequel ces récepteurs présentent une haute affinité. La concentration des récepteurs marqués restant lié au ligand au fond des puits est déterminée par fluorescence. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme négative du logarithme de la concentration et sont résumés dans le Tableau 5.

| Composés | NKR-P1A | CD69 |
|--|-----------------------|-----------------------|
| | -log IC ₅₀ | -log IC ₅₀ |
| GlcNAc | 5.8±0.1 | 4.2 ±0.5 |
| R-(αGalNAc) ₄ | 5.6±0.2 | - |
| R-Ox ₄ LELTE ₂ 80b | 5.8±0.9 | 7.1±0.1 |
| R-(αGalNAc) ₄ LELTE ₂ 80a | 8.8±0.2 | 9.8±0.1 |
| R-LELTE ₄ Ox ₂ 75b | 6.6±0.2 | 8.7±0.5 |
| R-LELTE ₄ (αGalNAc) ₂ 75a | 8.5±0.4 | 11.0±0.1 |

Tableau 5 : Résultats des tests d'inhibition réalisés pour les récepteurs NKR-P1A et CD-69

Les résultats confirment les spécificités des récepteurs. En effet, avec NKR-P1A qui reconnaît le GalNAc uniquement, les valeurs d'IC₅₀ les plus élevées sont obtenues pour les glycoconjugués R-(αGalNAc)₄LELTE₂ **80a** et R-LELTE₄(αGalNAc)₂ **75a**. Dès lors que le sucre n'est plus présent, aucune inhibition significative n'est observée. Pour le récepteur CD69 qui reconnaît les composés N-acétylhexosamines et le peptide LELTE, le meilleur inhibiteur est le conjugué R-LELTE₄(αGalNAc)₂ **75a** qui montre un IC₅₀ exceptionnel de 10⁻¹¹ M. La diminution d'inhibition observée lorsque les sucres et/ou le peptide n'est pas présent montre l'importance de ces deux structures pour l'interaction avec le récepteur CD69.

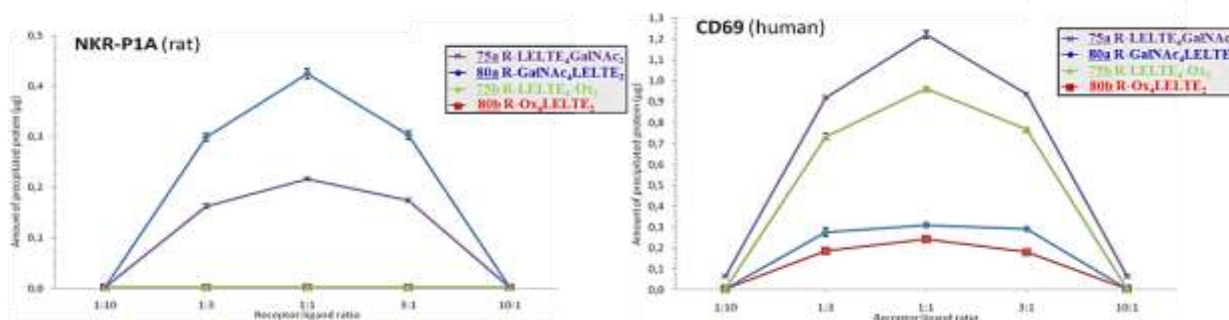


Figure 104. Test de précipitation des récepteurs par nos glycoclusters

Un second test a été réalisé afin de mesurer la capacité des composés à précipiter les récepteurs cibles. Il est en effet admis que ce type de test permet d'évaluer les propriétés d'un ligand à reproduire les interactions se produisant naturellement avec un récepteur membranaire¹⁶⁰. Avec NKR-P1, la précipitation la plus efficace a lieu avec les composés possédant 2 ou 4 sucres, mais lorsque seuls les peptides LELTE sont présent aucun effet n'est

observé. Ceci est conforme avec la spécificité connue pour ce récepteur avec le GalNAc uniquement. En revanche, les meilleurs candidats avec CD69 sont les R-LELTE₄(α GalNAc)₂ **75a** et R-LELTE₄Ox₂ **75b**, ce qui est également cohérent avec les propriétés de reconnaissance de ce récepteur avec le GalNAc et la séquence LELTE. Il est donc indispensable de présenter de manière multivalente le peptide LELTE pour induire la précipitation de CD69. Les résultats de ce test montre bien que les meilleurs candidats identifiés lors du test d'inhibition décrit dans la partie précédente sont capables d'induire un effet de cross-linking avec les récepteurs NKR-P1A ainsi que CD69.

✓ *Effet des glycoconjugués sur l'activation des cellules NK*

L'activation cellulaire a été étudiée selon deux méthodes. Je ne vous présenterai ici que les résultats obtenus par quantification de la production d'inositolphosphate induite lors de l'activation des cellules NK en présence de nos composés. Ce test est réalisé sur des cellules sanguines mononucléées du sang périphérique (PBMC) enrichies en inositol marqué par du tritium. L'activité cellulaire est évaluée en mesurant la radioactivité due à la production d'inositolphosphate tritié. Les résultats obtenus sont reportés en Figure 105.

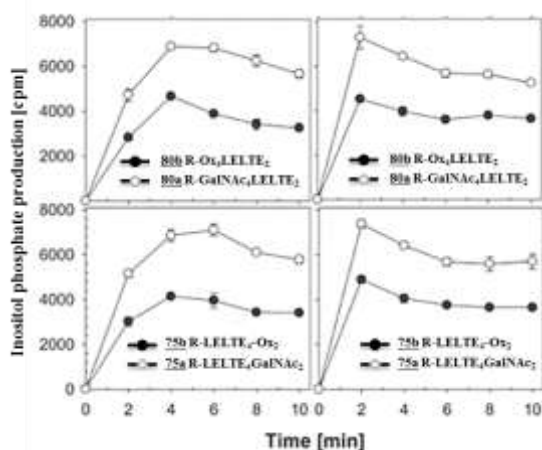


Figure 105. Production d'inositolphosphate dans les lymphocytes en présence des composés

Tout d'abord, nous avons observé que les conjugués R-Ox₄LELTE₂ **80b** et R-LELTE₄Ox₂ **75b** induisent une réponse cellulaire comparable à celle des composés de référence. Cependant, les meilleurs effets sont observés avec les glycoconjugués R-(α GalNAc)₄LELTE₂ **80a** et R-LELTE₄(α GalNAc)₂ **75a** contenant à la fois les sucres et les peptides qui induisent une forte augmentation de la production d'inositolphosphate. Cet effet est confirmé par le second test

d'activité cellulaire qui mesure le relargage du calcium au sein de la cellule et dont je ne parlerai pas ici¹⁶².

✓ *Potentiel anti-tumoral des glycoconjugués*

Des essais ont ensuite été réalisés pour évaluer la capacité de ces composés à provoquer la lyse de cellules tumorales (YAC-1 lymphoma tumors) par des cellules PBMC humaines. Ce test repose sur la mesure de libération de Cr⁵¹ après lyse de la cellule. Les résultats obtenus montrent que les glycoconjugués R-(α GalNAc)₄LELTE₂ **80a** et R-LELTE₄(α GalNAc)₂ **75a** provoquent l'activation de l'effet cytotoxique par les lymphocytes sur les cellules tumorales. Ici encore, la présence des sucres et des peptides LELTE sont indispensables à l'activité cytotoxique (Figure 106).

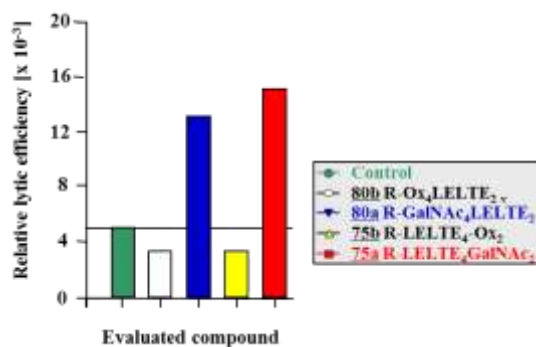


Figure 106. *Evaluation de l'activité anti-tumorale des composés*

Un des inconvénients possible de la suractivation des cellules NK par ce type de composé est leur capacité à induire un phénomène d'auto-apoptose qui rendrait leur utilisation impossible. Pour vérifier l'absence de cet effet, nos composés ont été testés à l'aide de marqueurs de protéines membranaires exprimées à la surface de cellules en phase d'apoptose. Aucune effet d'apoptose significatif des cellules NK n'a été observé avec nos activateurs au contraire du contrôle positif réalisé avec l'arsenite.

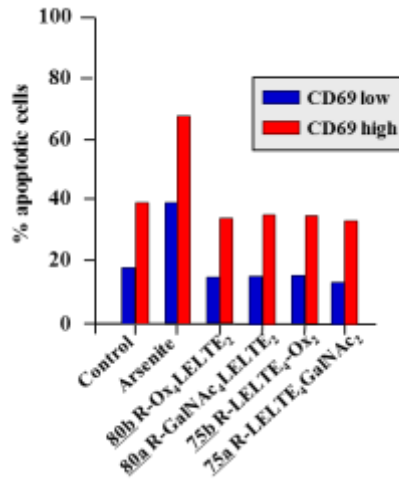


Figure 107. Etude de l'effet des composés sur l'apoptose de lymphocytes

Pour conclure, ces travaux montrent pour la première fois que des composés multivalents polyfonctionnels possédant des peptides et des sucres peuvent se lier très efficacement aux cellules NK, notamment via le récepteur humain CD69, et induire une activation cellulaire très efficace contre des tumeurs. De plus, ces composés n'induisent pas d'effets secondaires d'auto-apoptose. Ces propriétés uniques et prometteuses permettent d'envisager une utilisation en immunothérapie humaine. Des essais sur animaux sont d'ailleurs en cours actuellement dans l'équipe de V. Kren.

J | A | C | S ARTICLES

Published on Web 04/26/2010

Synthesis of Multivalent Glycoconjugates Containing the Immunoactive LELTE Peptide: Effect of Glycosylation on Cellular Activation and Natural Killing by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Olivier Renaudet,^{*,‡} Karel Křenek,^{†,§} Isabelle Bossu,[†] Pascal Dumy,[†] Alan Kádek,^{†,§} David Adámek,^{†,§} Ondřej Vaněk,^{†,§} Daniel Kavan,^{†,§} Radek Gažák,[†] Miroslav Šulc,[†] Karel Bezouška,^{†,§} and Vladimír Křen^{*,†}

Département de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250 and ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnská 1083, CZ-14220 Praha 4, Czech Republic, and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University Prague, Hlavova 8, CZ-12840 Praha 2, Czech Republic

Received February 12, 2010; E-mail: kren@biomed.cas.cz; olivier.renaudet@ujf-grenoble.fr

Abstract: Pentapeptide diacidic sequence LELTE, derived from the mycobacterial heat shock protein hsp65, has been recently identified as a “danger” signal of the immune system effective via specific binding to the universal leukocyte triggering receptor CD69. This sequence is not active per se, only after its presentation within the multivalent environment of its parent protein, or after artificial dimerization using a standard bifunctional reagents. Here we describe an entirely new way of presenting of this peptide based on its attachment to a cyclopeptide RAFT scaffold (K-K-K-P-G)₂ through the ϵ -amino group of lysine residues, alone or in combination with the carbohydrate epitope α GalNAc. The ability of such RAFT scaffolds to precipitate the target CD69 receptor or to activate CD69-positive cells is enhanced in compounds **2** and **4** possessing combined peptide/carbohydrate expression. Compounds **2** and **4** are highly efficient activators of natural killer lymphocytes, but they are completely inactive from the point of view of activation-induced apoptosis of lymphocytes by the target cells. These unique properties make the combined peptide/carbohydrate RAFTs highly suitable for future evaluation in animal tumor therapies in vivo and predict them to be readily available and efficient immunoactivators.

1. Introduction

Natural killer (NK) cells are effector lymphocytes of the innate immune system that control tumors and microbial infections.^{1,2} Since NK cells do not possess a single “major” activating receptor of the T-cell receptor or B-cell receptor type, a large repertoire of sophisticated activating and inhibitory receptors has evolved to regulate NK cell activities, ensuring that they protect the host against pathogens, yet prevent deleterious NK-cell-driven autoimmune responses.³ The large array of receptor–ligand pairs clustering at the NK cell–target cell interface known as “zipper” involve ligands such as sialic acids, collagen, MHC (major histocompatibility complex) glycoproteins, as well as receptors: members of the immunoglobulin, integrin, viral hemagglutinin, and calcium-dependent (C-type lectin) families.¹

Lymphocyte receptors belonging to the C-type lectin receptor family have evolutionarily diverged to recognize not only

carbohydrates (the classical ligands for C-type lectins), but also calixarene derivatives⁴ and peptide or protein molecules.⁵ Prominent among these receptors is NKR-P1A (CD161) shown previously to represent one of the major activating receptors on NK cells of rodents.⁶ NKR-P1A receptor appears to be a genuine lectin interacting both with simple sugars such as GlcNAc or GalNAc⁷ and with certain oligosaccharide sequences.⁸ GlcNAc conjugates based on glycodendritic⁹ or calixarene⁵ cores have also been identified as efficient NK cell activators and compounds active in experimental tumor

[†] Institute of Microbiology.

[‡] Université Joseph Fourier.

[§] Charles University Prague.

(1) Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walter, T.; Ugolini, S. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 503–510.

(2) Di Santo, J. P. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 473–475.

(3) Langer, L. L. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 495–502.

(4) Křenek, K.; Kuldová, M.; Hufíková, K.; Štíber, I.; Lhoták, P.; Dudič, M.; Budka, J.; Pelantová, H.; Bezouška, K.; Křen, V. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1781–1792.

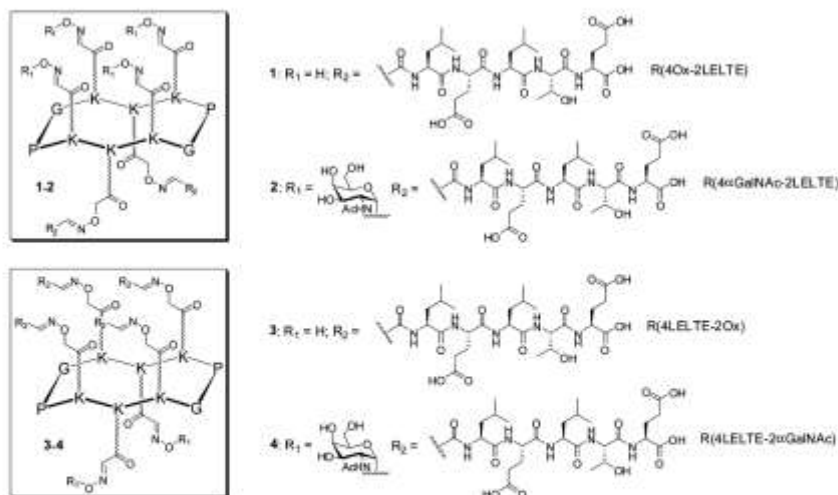
(5) Bezouška, K. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 535–563.

(6) Giordà, R.; Rudert, W. A.; Vavassori, C.; Chambers, W. H.; Hiserodt, J. C.; Trucco, M. *Science* **1990**, *249*, 1298–1300.

(7) (a) Bezouška, K.; Vlahus, G.; Horváth, O.; Jinochová, G.; Fíšerová, A.; Giordà, R.; Chambers, W. H.; Feizi, T.; Pospíšil, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16945–16952. (b) Bezouška, K.; Šklenář, J.; Dvořáková, J.; Havlíček, V.; Pospíšil, M.; Thiem, J.; Křen, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *238*, 149–153.

(8) Krist, P.; Hetkammerová-Rajnošková, E.; Rausvolfová, J.; Seměňuk, T.; Vavrušková, P.; Pivlíček, J.; Bezouška, K.; Petruš, L.; Křen, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *287*, 11–20.

(9) (a) Bezouška, K.; Křen, V.; Kieburg, C.; Lindhorst, T. K. *FEBS Lett.* **1998**, *426*, 243–247. (b) Krist, P.; Vannucci, L.; Sadalajure, K.; Patel, A.; Bezouška, K.; Pospíšil, M.; Kuzma, M.; Lindhorst, T. K.; Petruš, L.; Křen, V. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 445–452.

Scheme 1. Structure of Divalent or Tetraivalent LELTE Conjugates and the Corresponding Glycoconjugates 1–4

therapies.^{10,11} On the other hand, not only is the related CD69 receptor expressed on the surface of NK cells, but it also represents the universal and rather widespread leukocyte signaling molecule.¹² It exhibits much more promiscuous reactivity that involves not only GlcNAc, GalNAc, and related carbohydrates but also carboxylated as well as sulfated oligosaccharide sequences.¹³ Most of the carbohydrate ligands for NKR-P1 and CD69 receptors have been shown to contain β -linked *N*-acetylhexosamines. However, studies using complex comblike dendrimers also revealed the reactivity of these receptors with α -linked GalNAc.¹⁴

We have recently identified another class of high-affinity ligands for the CD69 receptor derived from the mycobacterial heat shock protein hsp65 (known to be one of the most immunogenic proteins) and consisting of the LELTE pentapeptide that has been shown to react with CD69 in its free form as well as with part of the extended protein sequence.¹⁵ An important prerequisite for this pentapeptide ligand to be able to cross-link the cellular form of CD69 and thus to have significant lymphocyte proliferation and immunostimulatory activities is its oligomerization. Thus, the native hsp65 protein bearing the internal LELTE sequence only activates the cells of the immune system in the form of oligomers or at least dimers and not those in monomeric form.¹⁵ Similarly, the monomeric peptide LELTE had very little effect on immune cell activation but had acquired a very potent ability to induce the proliferation of resting human lymphocytes and production of lymphokines after a simple

chemical dimerization through its unique N-terminal amino groups using bifunctional reagents such as disuccinimidyl tartrate or disuccinimidyl glutarate.^{15,16}

Here we describe the synthesis and evaluation of the biological activities of another class of LELTE conjugates in which the LELTE peptides were coupled onto a cyclodecapeptide scaffold (namely RAFT) using an oxime-based ligation strategy.^{17–19} Two classes of these compounds have been prepared (Scheme 1): in one class, we attached two or four LELTE peptide sequences to the cyclic peptide core together with free oxime groups as the controls (R(4Ox-2LELTE) **1** and R(4LELTE-2Ox) **3**, respectively), while the second class contains an additional substitution with either four or two α -GalNAc monosaccharides attached through an oxime ether linkage (R(4 α GalNAc-2LELTE) **2** and R(4LELTE-2 α GalNAc) **4**, respectively). When we tested the ability of these compounds to activate CD69⁺ lymphocytes, the activity of LELTE-modified RAFTs was comparable with that exhibited by the previously tested LELTE dimers. However, the additional conjugation with α -GalNAc resulted in a significant increase in their activation abilities, possibly due to cross-linking CD69 with another class of lymphocyte receptors such as NKR-P1. Compound **4**, a RAFT tetrasubstituted with LELTE and glycosylated with two α -GalNAc residues, increased the natural killing of human peripheral blood mononuclear cells approximately 3-fold compared to the control, making it an interesting compound for future use in experimental therapies of tumors. Interestingly, the binding of RAFTs including compound **4** induced only minimal activation-induced apoptosis of the CD69⁺ effector cells.

- (10) Pospíšil, M.; Vannucci, L.; Horváth, O.; Fišerová, A.; Krausová, K.; Bezouška, K.; Mosca, F. *Int. J. Oncol.* **2000**, *16*, 267–276.
- (11) Vannucci, L.; Fišerová, A.; Sadalpure, K.; Landborst, T. K.; Kaldová, M.; Rossman, P.; Horváth, O.; Křen, V.; Krist, P.; Bezouška, K.; Luptovcová, M.; Mosca, F.; Pospíšil, M. *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 285–296.
- (12) Testi, R.; D'Ambrosio, D.; De Maria, R.; Santoni, A. *Immunol. Today* **1994**, *15*, 479–483.
- (13) Bojarová, P.; Křenek, K.; Wetjen, K.; Adamiak, K.; Pelantová, H.; Bezouška, K.; Elling, L.; Křen, V. *Glycobiology* **2009**, *19*, 509–517.
- (14) Vepřek, P.; Hajdúch, M.; Džubák, P.; Kuklík, R.; Poláková, J.; Bezouška, K. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6400–6407.
- (15) Bezouška, K.; Pavlíček, J.; Sopko, B.; Křen, V.; Fišerová, A.; Pospíšil, M.; Novák, P.; Havlíček, V. *Scand. J. Immunol.* **2001**, *54* (1), 26.

- (16) Bezouška, K.; Kavan, D.; Mrázek, H.; Manglová, D.; Bašová, P.; Křen, V. *FEBS J.* **2008**, *275* (Suppl. 1), 81.
- (17) (a) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255–1258. (b) Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243–246.
- (18) Renaudet, O. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 274–286.
- (19) Boturny, D.; Defranco, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbé, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 224–240.
- (20) Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2628–2636.

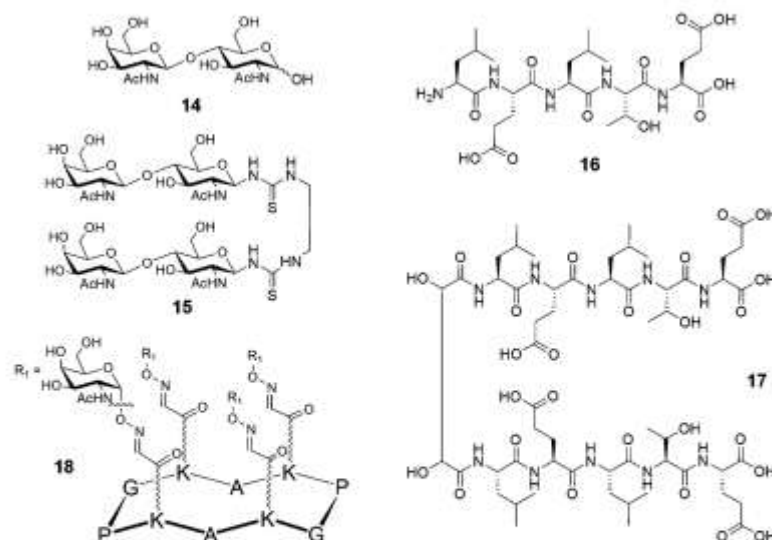
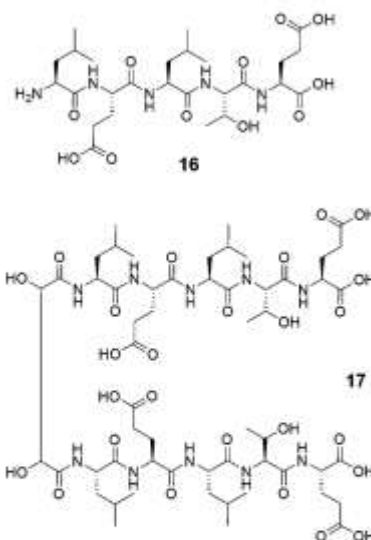


Figure 1. Structures of compounds 14–18.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and General Procedures. Protected amino acids and resins were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP was purchased from France Biochem and HBTU from Biosolve B.V. The other reagents were obtained from either Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France). Solid-phase peptide synthesis was performed using Fmoc/tBu chemistry on an automated synthesizer 433A (Applied Biosystem). Linear peptide sequences precursor of the RAFT cyclopeptides **5** and **11** and the LELTE peptide were prepared using the preloaded Fmoc-Gly-SASRIN resin and 2-chlorotrityl resin respectively, on a 0.25 mmol scale in NMP with HBTU as coupling reagent. The 0.25 mmol scale program (SynthAssist version 2) was used with a single coupling. The instrument was coupled to a Perkin-Elmer 200S UV/vis detector ($\lambda = 301$ nm, absorbance range = 0.025A, rise time = 2 s). Reverse-phase HPLC analyses were performed on Waters equipment using C_{18} columns. The analytical (Nucleosil 120 Å 3 μ m C_{18} particles, 30 \times 4.6 mm²) was operated at 1.3 mL/min and the preparative (Delta-Pak 300 Å 15 μ m C_{18} particles, 200 \times 25 mm²) at 22 mL/min with UV monitoring at 214 and 250 nm using a linear A/B gradient (buffer A: 0.09% CF_3CO_2H in water; buffer B: 0.09% CF_3CO_2H in 90% CH_3CN). Routine mass spectra were obtained for each intermediate by electrospray ionization on a VG Platform II. Accurate mass spectra were measured for conjugates **1–4** on a MALDI-APEX Qe-FT-ICR mass spectrometer equipped with a 9.4 T superconducting magnet and a ion Combi Source (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). All spectra were acquired in positive ion mode with a broad m/z range (850–5000) and calibrated externally using the monoisotopic $[M + H]^+$ ions. A 5 mg/mL solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid or 10 mg/mL solution of 2,5-dihydrobenzoic acid in 50% $CH_3CN/0.3\%$ CH_3CO_2H was used as a MALDI matrix and was premixed with dissolved sample before loading on the target. The preparation of *N*-acetyl lactosamine disaccharide **14** and its dimeric form **15** has been described previously.¹³ The control LELTE pentapeptide **16** was purchased from Xaia (Lund, Sweden), and dimerized (compound **17**) using a DST cross-linker as described previously.¹⁶ Preparation of the compound R(4GalNAc) (**18**) has been described previously (Figure 1).^{17b}



2.2. Synthesis of R(4BocSer(tBu)-2Dde) (5**).** The linear decapeptide precursor of **5** (0.25 mmol) was cyclized while highly diluted in CH_2Cl_2 (500 mL) with PyBOP (156 mg; 0.3 mmol) and DIPEA (82 μ L; 0.5 mmol; pH 8). After stirring for 1 h at room temperature, the solution was evaporated to dryness and peptide **5** recovered by precipitation in Et_2O . Analytical RP-HPLC of the crude reaction mixture shows complete conversion of the linear decapeptide into **5**. $R_t = 14.9$ min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{113}H_{201}N_{20}O_{30}$ 2378.5; found: m/z 2378.1 $[M + H]^+$.

2.3. Synthesis of R(4BocSer(tBu)-2Eei) (7**).** Protected cyclodecapeptide **5** (0.25 mmol) was treated for 1 h at room temperature with a solution of 3% hydrazine in DMF (50 mL). After evaporation and precipitation in Et_2O , Eei-Aos-OSu **6** (129 mg; 0.5 mmol) and DIPEA (83 μ L; 0.5 mmol; pH 8) were added, and the solution was stirred in DMF (25 mL). The coupling reaction was monitored by analytical HPLC and reached completion after 2 h. The solvent was then evaporated using a high-vacuum pump and the excess of **6** removed by precipitation in Et_2O . Compound **7** was used without further purification. Yield: 52% (300 mg; 0.13 mmol) from the corresponding linear peptide sequence (three steps); analytical RP-HPLC: $R_t = 14.1$ min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{110}H_{195}N_{22}O_{32}$ 2336.4; found: m/z 2336.2 $[M + H]^+$.

2.4. Synthesis of R(4Ser-2ONH₂) (8**).** Crude compound **7** (196 mg; 0.084 mmol) was treated with a cocktail of TFA/TIS/ H_2O (50 mL; 95:2.5:2.5 v/v/v). After 2 h of stirring at room temperature, the solution was evaporated, and fully deprotected cyclodecapeptide **8** was recovered by precipitation in Et_2O as a white TFA salt. Analytical RP-HPLC of the crude reaction mixture shows complete conversion of the protected sequence **7** into **8**. $R_t = 5.7$ min (5 to 60% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{86}H_{119}N_{22}O_{22}$ 1571.9; found: m/z 1571.9 $[M + H]^+$.

2.5. Synthesis of R(4Dde-2BocSer(tBu)) (11**).** Cyclodecapeptide **11** was synthesized by following the procedure described for **5**. Analytical RP-HPLC of the crude reaction mixture shows complete conversion of the corresponding linear decapeptide into **11**. $R_t = 12.9$ min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{114}H_{185}N_{18}O_{26}$ 2220.4; found: m/z 2220.1 $[M + H]^+$.

2.6. Synthesis of R(4Eei-2BocSer(tBu)) (12**).** Compound **12** was synthesized by following the procedure described for **7**. After

Dde removal with hydrazine, the incorporation of an aminoxy linker was achieved using Eei-Aoa-OSu (387 mg; 1.5 mmol) and DIPEA (165 μ L; 1 mmol; pH 8) in DMF (25 mL). Yield: 65% (340 mg; 0.16 mmol) from the corresponding linear peptide sequence (three steps); analytical RP-HPLC: R_t = 12.7 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{66}H_{117}N_{27}O_{30}$ 2136.3; found: m/z : 2136.1 [M + H]⁺.

2.7. Synthesis of R(4ONH₂-2Ser) (13). Compound **13** was synthesized by following the procedure described for **8**. Analytical RP-HPLC of the crude reaction mixture shows complete conversion of the protected sequence into **13**. R_t = 5.7 min (5 to 60% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{66}H_{115}N_{27}O_{22}$ 1543.8; found: m/z : 1543.6 [M + H]⁺.

2.8. Synthesis of R(4Ox-2LELTE) (1). Peptide **8** (14 mg; 0.0069 mmol) was dissolved in a mixture of CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v), and LELTE-CHO **9** (27 mg; 0.041 mmol) was added to the solution. The mixture was stirred at 37 °C overnight, and then acetone (1 mL) was added. The resulting LELTE conjugate R(4Ser-2LELTE) (analytical RP-HPLC: R_t = 12.6 min (5 to 40% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{122}H_{205}N_{42}O_{46}$ 2854.5; found: m/z : 2854.3 [M + H]⁺) was used without further treatment. Sodium periodate (59 mg; 0.28 mmol) was then added to the crude solution of R(4Ser-2LELTE) and the mixture purified by RP-HPLC (R_t = 13.1 min, (5 to 100% B in 30 min, 214 nm) after 1 h to isolate the corresponding R(4CHO-2LELTE) in 95% yield (18 mg; 0.0066 mmol) from **8** (two steps). Analytical RP-HPLC: R_t = 12.9 min (5 to 60% B in 15 min, 214 nm). This compound (9 mg; 0.0033 mmol) was finally stirred at 37 °C with hydroxylamine hydrochloride (1.8 mg; 0.026 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v). After RP-HPLC purification (R_t = 13.9 min, (5 to 100% B in 30 min, 214 nm), compound **1** was obtained with a 70% yield (6.5 mg; 0.0023 mmol). Analytical RP-HPLC: R_t = 7.6 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-FT-ICR HRMS data are given in Supporting Information, Table 1.

2.9. Synthesis of R(4 α GalNAc-2LELTE) (2). Compound **2** was obtained from R(4CHO-2LELTE) (9 mg; 0.0033 mmol) and GalNAc- α ONH₂²⁰ **10** (8 mg; 0.033 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v) following the procedure described for **1**. Yield: 80% (9.5 mg; 0.0026 mmol); semi-preparative RP-HPLC: R_t = 17.8 min (5 to 60% B in 30 min, 214 nm); analytical RP-HPLC: R_t = 7.1 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-FT-ICR HRMS data are given in Supporting Information, Table 1.

2.10. Synthesis of R(4LELTE-2Ox) (3). Compound **3** was prepared following the three-step procedure described for **1**. The R(4ONH₂-2Ser) **13** (12 mg; 0.0068 mmol) was first treated with LELTE-CHO **9** (28 mg; 0.041 mmol). The resulting R(4LELTE-2Ser) (analytical RP-HPLC: R_t = 8.3 min, 5 to 100% B in 15 min, 214 nm; ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{176}H_{259}N_{42}O_{70}$ 4109.0; found: m/z : 4109.5 [M + H]⁺) was then oxidized with sodium periodate (29 mg; 0.14 mmol) in water (7 mL). The R(4LELTE-2CHO) was purified by RP-HPLC. Yield: 91% (25 mg; 0.006 mmol) from **13** (two steps); semi-preparative RP-HPLC: R_t = 14.6 min (5 to 100% B in 30 min, 214 nm); analytical RP-HPLC: R_t = 8.3 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm). This oxidized compound (11 mg; 0.0027 mmol) was reacted with hydroxylamine hydrochloride (0.8 mg; 0.011 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v) to obtain **3** after purification. Yield: 68% (7.5 mg; 0.018 mmol); semi-preparative RP-HPLC: R_t = 14.9 min (5 to 100% B in 30 min, 214 nm); analytical RP-HPLC: R_t = 8.4 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-FT-ICR HRMS data are given in Supporting Information, Table 1.

2.11. Synthesis of R(4LELTE-2 α GalNAc) (4). Compound **4** was obtained from R(4LELTE-2CHO) (14 mg; 0.0034 mmol) and GalNAc- α ONH₂²⁰ **10** (3 mg; 0.014 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v) following the procedure described for **3**. Yield: 66% (10 mg; 0.0022 mmol); semi-preparative RP-HPLC: R_t = 14.2 min (5 to 100% B in 30 min, 214 nm); analytical RP-HPLC: R_t =

8.1 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-FT-ICR HRMS data are given in Supporting Information, Table 1.

2.12. Plate Binding and Plate Inhibition Assays. Inhibition assays were performed as described previously^{21,22} with the difference that the soluble NKR-P1 and CD69 protein receptors were labeled with fluorescent labels (fluorescein and rhodamine, respectively). The concentration of bound protein receptors in the microtiter wells was determined by fluorescence ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 496/519 nm and $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 546/577 nm, respectively) using a Safire 2 spectrophotometer (Tecan, Austria). The results are given as a negative logarithm of the ligand concentration required to cause 50% inhibition of the receptor's binding to the standard high-affinity ligand GlcNAc₂BSA (-log IC₅₀). Proteins were labeled by the covalent attachment of fluorescent labels, using *N*-hydroxysuccinimide fluorescein and *N*-hydroxysuccinimide rhodamine (both from Pierce Biotechnology, USA) for rat NKR-P1A and human CD69 receptors, respectively. Briefly, 1 mg of the activated dye was dissolved in 50 μ L of methanol/DMSO mixture (50:50, v/v), and 10 μ L of this solution was mixed with 90 μ L of protein (10 mg/mL) in 10 mM PIPES buffer pH 6.8 with 49 mM NaCl and 1 mM Na₂S₂O₃. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 2 h, and the excess of unreacted dye was removed using repeated cycles of dilutions with the above buffer, and concentrations using a Centricon 10 device. Finally, the labeled protein was repurified, using reverse-phase chromatography and gel filtration,^{21,22} and stored at 4 °C as a 10 mg/mL solution before use in the binding assay. The labeling resulted in the attachment of four molecules of fluorescein and five molecules of rhodamine per mol of NKR-P1A and CD69, respectively, as determined by quantitative spectrophotometry, MALDI-TOF, and ion cyclotron FT-MS.²³ Preliminary binding curves were performed with the starting and the labeled proteins using microtiter wells coated with GlcNAc₂BSA in order to verify that the labeling procedure did not have any adverse effects on the binding activity of the receptors.

2.13. Precipitation Assays. Each ligand was dissolved in water at concentrations of 200, 60, 20, 6, and 2 nM. The ¹²⁵I-labeled protein (50 μ L, 20 nM) was added to each sample (50 μ L) in 96-well microtiter plates. Mixtures were incubated at 4 °C for 30 min, and then a 20% (v/v) solution of PEG 8000 was added (100 μ L). The mixture was left to precipitate for one hour at 4 °C. After centrifugation (10 min, 4 °C, 1800 rpm), the supernatant was carefully removed, and a 10% (v/v) solution of PEG 8000 (100 μ L) was added. This procedure was repeated three times to wash the precipitate. After additional centrifugation and supernatant removal, the precipitates were dried overnight at 37 °C. The assay was continued as described previously.²³

2.14. Inositolphosphate Production. [³H]inositol phosphates were separated and quantified by the methods described previously.²⁴ Incorporation of [³H]inositol into the phospholipid was achieved by incubating human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (10⁷ cells/mL) with 100 μ L of [³H]inositol (1.48 TBq/mol, 37 MBq/mL, GE Healthcare) for 3 h at 37 °C, followed by extensive washing, and resuspension at 10⁶ cells/mL. 50 μ L of this suspension containing 5 \times 10⁶ cells in complete RPMI 1640 with 10 mM HEPES pH 7.4 was mixed with 50 μ L of the tested compounds, and incubated at 37 °C for the indicated times. The reaction was stopped by rapid transfer of the reaction mixture to 100 μ L of 10% trichloroacetic acid. The reaction was neutralized by the addition of 50 μ L of triethylamine; 20 μ L of 50% aqueous slurry of Dowex I-X8, 100–200 mesh (Sigma) in formate form was then added. The supernatant was collected, and inositolbisphosphates and

- (21) Pavlíček, J.; Sopko, B.; Etrich, R.; Kopecký, V., Jr.; Bannruk, V.; Man, P.; Havlíček, V.; Vrbický, M.; Martínková, L.; Křen, V.; Pospíšil, M.; Bezouška, K. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9295–9306.
 (22) Vaněk, O.; et al. *FEBS J.* **2008**, *275*, 5589–5606.
 (23) Bezouška, K.; Snajdrová, R.; Křenek, K.; Vančurová, M.; Kádek, A.; Adámek, D.; Lhoták, P.; Kavan, D.; Hořbauerová, K.; Man, P.; Bojarová, P.; Křen, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1434–1440.
 (24) Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Goldlien, R. D.; Hiserodt, J. C.; Scaman, W. E. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 3244–3250.

inositoltrisphosphates were eluted by the addition of 50 μ L of 0.3 and 0.6 M ammonium formate pH 7.0, respectively. The eluent was dried in a thin-walled 96-well plate, and the radioactivity was counted in 100 μ L of Biodegradable Counting Scintillant (GE Healthcare) using the Microbeta counter (Wallac).

2.15. Intracellular Calcium Monitoring.²⁴ Human PBMC were loaded with the calcium-sensitive fluor Indo-1 by incubating 10^7 cells/mL with 5 μ M Indo-1, AM (Molecular Probes, Eugene, OR) in complete RPMI 1640 with 25 μ M 2-ME at 37 °C. Cells were washed twice and resuspended at 5×10^6 cells/mL in fresh medium. The fluorescence of the cell suspension was monitored with a Safire2 spectrofluorimeter using an excitation wavelength of 349 nm and emission wavelength 410 nm. The signal was calibrated for each experiment by lysing the Indo-1-loaded cells with Triton X-100 (0.07%) for maximum fluorescence. The minimum fluorescence was determined after the addition of 10 mM EGTA and sufficient Tris base to raise the pH to >8.3. Intracellular calcium concentration was calculated using the formula: $[Ca^{2+}]$ (nmoles) = $250 \times [(F - F_{min})/(F_{max} - F)]$ where F is the measured fluorescence, and 250 (nM) is the dissociation constant of Indo-1. Signaling was measured in the absence of extracellular calcium in medium containing 1 mM EGTA. Where indicated, ionomycin (Sigma) was added to a final concentration of 1 μ M.

2.16. Natural Killing. The standard ⁵¹Cr release test was performed as described previously.²⁵ Briefly, 10^4 chromium-labeled leukemic cells K562 in 100 μ L of complete RPMI 1640 was mixed in triplicates with the tested compounds in 50 μ L of RPMI 1640 in round-bottomed 96-well plates. Thereafter, the appropriate amount of effector cells (PBMC obtained by Ficoll-Isopaque separation)²⁶ was added in 100 μ L of complete RPMI 1640, and the plate was placed into a tissue incubator and incubated at 37 °C for 3 h. Triton X-100 (50 μ L of 1%) was added into the maxima release wells, and the incubation continued for another 1 h. Plates were cooled on an ice bath, and 100 μ L of the supernatant was used for radioactivity measurements. Specific lysis (%) was calculated using the formula % = $[(exp - spont)/(max - spont)] \times 100$, where exp are the counts in experimental wells, spont counts in wells containing medium instead of the effector cells, and max are the counts in wells containing 1% Triton X-100. Complete killing curves were constructed, from which the lytic unit counts for individual experiments were calculated. Lytic efficiency was defined as the inverse of the lytic unit count.

2.17. Apoptosis Assays. Cells were resuspended at 2×10^6 mL in complete RPMI 1640 medium and aliquoted into round-bottomed 96-well plates, and then the tested concentrations of compounds were added into duplicate test wells. Individual tested compounds were added 12 and 6 h before the estimation of the percentage of apoptotic cells using Annexin V-FITC/Hoechst 33258 staining and flow cytometry. The percentage of apoptotic cells (Annexin V⁺/Hoechst 33258⁻) observed in the presence of PBS alone or in the presence of 5×10^{-6} M arsenite were used as the negative and positive controls, respectively.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Analysis of LELTE Conjugates and Glycoconjugates 1–4. Unglycosylated and glycosylated LELTE conjugates 1–4 were fully synthesized following the highly efficient iterative oxime procedure reported earlier.^{27,28} For this purpose, two different cyclodecapeptide cores 5 and 11 were prepared. In the first RAFT core 5, four Fmoc-Lys(BocSer-

(tBu)OH building blocks²⁹ and two orthogonally protected lysines with 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl (Dde)³⁰ were used, whereas two building blocks and four Fmoc-Lys(Dde)OH were used for RAFT core 11 (Scheme 2). In both cases, the selective removal of Dde by treatment with hydrazine was followed by the incorporation of the ethoxyethylidene aminoxy acetic acid linker as the *N*-hydroxysuccinimidyl ester 6 (Eci-Aoa-OSu)³¹ on the free lysine side chain to produce protected RAFT cores 7 and 12. Final acidic treatment with a solution of trifluoroacetic acid and carbocation scavengers yielded 8 and 13, displaying either four or two serines as aldehyde precursor and two or four aminoxy groups.

The complete assembly of each LELTE conjugate was performed by successive oxime bond formation and serine oxidation steps.²⁸ A pentapeptide LELTE-aldehyde 9 was first synthesized by oxidative cleavage from the corresponding hexapeptide sequence containing a serine residue at the *N*-terminal end.³² An excess of 9 was further used for coupling to the aminoxy-containing RAFT cores 8 and 13 under mild aqueous acidic conditions. We thus quantitatively obtained two classes of conjugates displaying two and four copies of the LELTE peptide, respectively. These synthetic intermediates were next treated with sodium periodate to generate the aldehyde functions required for further coupling of the second addressable domain of the RAFT core with hydroxylamine or aminoxy α GalNAc 10.²⁹ As illustrated in Supporting Figure S2 for 1 and 2, analytical HPLC monitoring during the coupling reaction showed that reactions were complete after a few hours and yielded pure products in the reaction mixtures. The excess of aminoxy reagents was finally removed, and hydroxylamine and α GalNAc LELTE conjugates 1–4 were isolated by RP-HPLC in good yields (66–80%). High-resolution mass spectra measured by MALDI-FT-ICR confirmed the well-defined structure of the synthesized LELTE conjugates (Supporting Information, Table 1).

3.2. Affinity of Control and Glycosylated LELTE Conjugates for CD69 and NKR-P1 Receptors. We tested the binding of the tested compounds to both recombinant rat NKR-P1 specific for GlcNAc and GalNAc, and recombinant human CD69 that binds both GlcNAc and GalNAc, as well as the LELTE pentapeptide. As the initial test, we used plate inhibition assays in which the evaluated compounds are tested as the inhibitors of binding of the above receptors to their high affinity ligands, GlcNAc₃BSA neoglycoprotein. A summary of the inhibition results is given in Table 1. The results clearly confirm the anticipated specificities of the two receptors. Thus with rat NKR-P1, high values of IC₅₀ were only recorded for the glycosylated LELTE conjugates (compounds R(4 α GalNAc-2LELTE) 2 and R(4LELTE-2 α GalNAc) 4), since the LELTE peptide is not recognized by this receptor. On the other hand, CD69 recognizes both *N*-acetylhexosamines and the LELTE peptide, and thus the highest activities are attained by compounds having both of these substitutions. In particular, R(4LELTE-2 α GalNAc) 4 is one of the best ligands for the human CD69 receptor identified so far with an IC₅₀ as low as 10^{-11} M (Table 1). Compound R(4 α GalNAc) (18) carrying only carbohydrate moieties was

(25) Brunner, K. T.; Manuel, J.; Cerottini, J. C.; Chapuis, B. *Immunology* **1968**, *14*, 181–196.

(26) Boyum, R. B. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1967**, *21*, 77–97.

(27) Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *5*, 1149–1159.

(28) Renaudet, O.; Boturyn, D.; Dumy, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3880–3883.

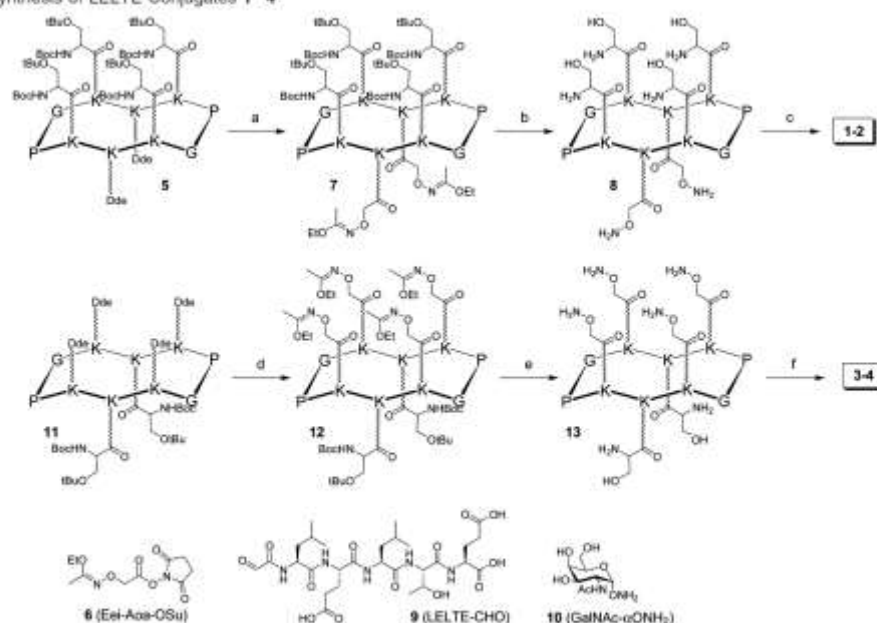
(29) Foillard, S.; Øysten Rasmussen, M.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983–991.

(30) Bycroft, B. W.; Chan, W. C.; Chuba, S. R.; Hone, N. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778–779.

(31) Duléry, V.; Renaudet, O.; Dumy, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11952–11958.

(32) Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138–146.

Scheme 2. Synthesis of LELTE Conjugates 1–4*



* Reagent and conditions: (a) i: hydrazine/DMF (3:97, v/v); ii: 6,²¹ DIPEA, DMF; (b) TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v); (c) i: 9, CH₂CN/H₂O/TFA (1:1:0.1, v/v/v); ii: NaIO₄, H₂O; 10,²⁰ CH₂CN/H₂O/TFA (1:1:0.1, v/v/v); (d) i: hydrazine/DMF (3:97, v/v); ii: 6,²¹ DIPEA, DMF; (e) TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v); (f) i: 9, CH₂CN/H₂O/TFA (1:1:0.1, v/v/v); ii: NaIO₄, H₂O; 10,²⁰ CH₂CN/H₂O/TFA (1:1:0.1, v/v/v).

Table 1. Summary of the Plate Inhibitions Assays Performed with the Tested Compounds and NKR-P1A and CD69 Receptors

| compound | −log IC ₅₀ |
|----------------------|-----------------------|
| NKR-P1A (rat) | |
| GlcNAc | 5.8 ± 0.1 |
| 18 R(4αGalNAc) | 5.6 ± 0.2 |
| 1 R(4Ox-2LELTE) | 5.8 ± 0.9 |
| 2 R(4αGalNAc-2LELTE) | 8.8 ± 0.2 |
| 3 R(4LELTE-2Ox) | 6.6 ± 0.2 |
| 4 R(4LELTE-2αGalNAc) | 8.5 ± 0.4 |
| CD69 (human) | |
| GlcNAc | 4.2 ± 0.5 |
| 18 R(4αGalNAc) | — ^a |
| 1 R(4Ox-2LELTE) | 7.1 ± 0.1 |
| 2 R(4αGalNAc-2LELTE) | 9.8 ± 0.1 |
| 3 R(4LELTE-2Ox) | 8.7 ± 0.5 |
| 4 R(4LELTE-2αGalNAc) | 11.0 ± 0.1 |

^a No inhibition detected at all.

used as a control to demonstrate importance of the LELTE peptide: it had no inhibitory activity with CD69 receptors and only limited activity with NKR-P1A that was comparable to a monosaccharide (Table 1).

In addition, we also tested the ability of the evaluated conjugates to precipitate the soluble recombinant receptor in a reaction that is more relevant to biologically relevant receptor cross-linking that serves as a prerequisite for membrane signaling and cellular activation. The precipitation reactions with rat NKR-P1 proceeded in accordance with the surface density of the preferred ligand, and thus the highest activities were achieved with R(4αGalNAc-2LELTE) **2**, having four GalNAc residues (Figure 2, upper). Similarly, the highest precipitation activities for CD69 could be achieved with the compounds R(4LELTE-2Ox) **3** and R(4LELTE-2αGalNAc) **4**, i.e. those that had high

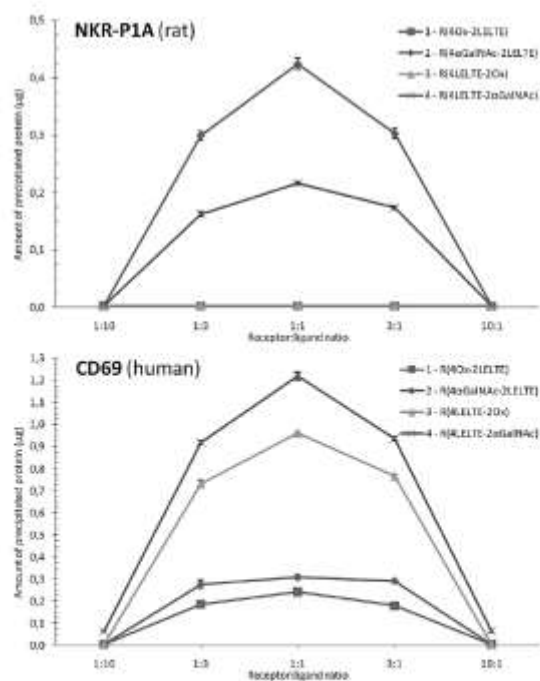


Figure 2. Precipitation curves for the interaction of the tested compounds with recombinant soluble rat NKR-P1A (upper) and human CD69 (lower). Results are the means of duplicate determinations from three representative experiments.

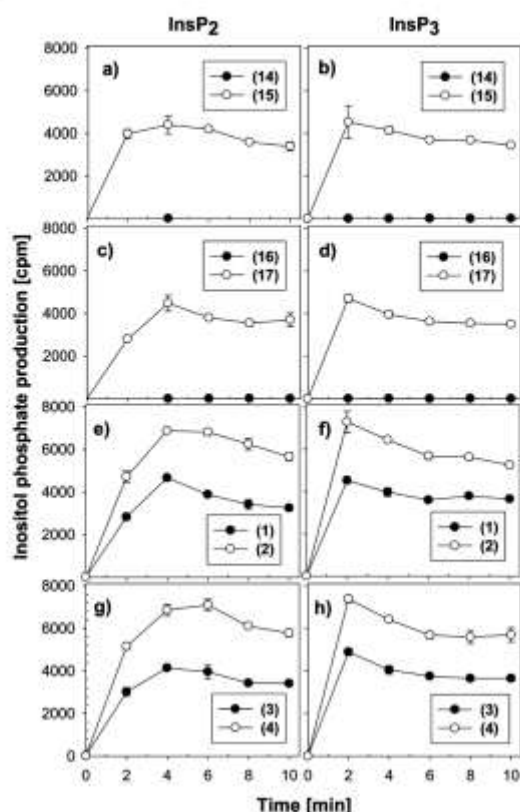


Figure 3. Inositol phosphate production in human PBMC incubated in the presence of tested compounds. The production of inositolbisphosphates (left column) and inositoltrisphosphates (right column) was followed for 10 min after the addition of compounds. Values are mean \pm range.

substitution with the LELTE peptide (Figure 2, lower). These results are understandable, since the affinity of the LELTE peptide for the CD69 receptor is much higher than that of the GalNAc monosaccharide.¹⁵

3.3. Effect of LELTE Conjugates Glycosylation on Cellular Activation of Human PBMC. To evaluate the effect of the glycosylation of LELTE conjugates on receptor-mediated activation, two different cellular activation assays routinely used for studies on other leukocyte receptors were performed. While monomeric ligands **14** and **16** had no effects on inositol phosphate production, dimeric forms **15** and **17** were active (Figure 3, panels a and b). The efficiency of leukocyte activation by LELTE conjugate **1** containing dimeric LELTE is comparable to **17**, and no additional effect could be seen using the LELTE conjugate R(4LELTE-2Ox) **3** with tetrameric LELTE (Figure 3, panels e–h). However, the glycosylated LELTE conjugates R(4GalNAc-2LELTE) **2** and R(4LELTE-2GalNAc) **4** displayed a clear synergistic effect on cellular signaling, resulting in significantly increased levels of inositol phosphate production (Figure 3, panels e–h).

The inositol phosphate data were further corroborated by monitoring intracellular calcium in the absence of an extracellular calcium source. Under these conditions, the generated inositol phosphates activate their specific receptors at the intracellular side of the endoplasmic reticulum (ER) membranes,

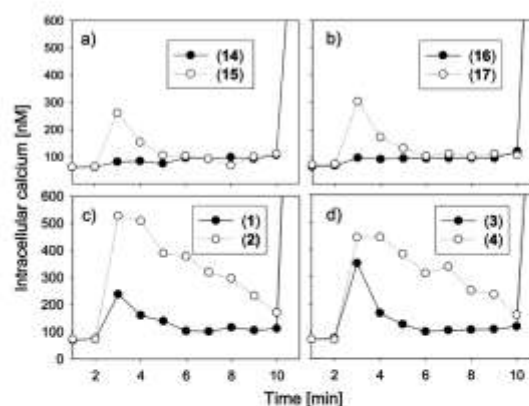


Figure 4. Effect of tested compounds on intracellular calcium levels in human PBMC incubated in the presence of tested compounds. Intracellular calcium was monitored for 2 min before the addition of tested compounds, and then for an additional 8 min in the presence of the tested compounds after which the ionomycin positive control was added. The experiment was conducted in the absence of extracellular calcium.

resulting in the opening of calcium channels and transfer of calcium from the ER into the cytoplasm. While monomeric ligands **14** and **16** had no effect on intracellular calcium levels, the dimeric forms of these ligands, **15** and **17**, resulted in short-term (more than 3 min) calcium signals (Figure 4, panels a and b). Using conjugate R(4LELTE-2Ox) **3** with tetrameric LELTE, the calcium signal was increased, but remained short-term (Figure 4, panel d). In the combined glycosylated LELTE conjugates, R(4GalNAc-2LELTE) **2** and R(4LELTE-2GalNAc) **4**, the calcium signal was significantly increased and sustained over a period of 8 min (Figure 4, panels c and d).

These results indicate that (1) CD69 receptor is very efficiently engaged by LELTE dimerized via a linear or RAFT scaffold and (2) further clustering of LELTE into tetrameric form does not have additional effects due to the saturation of the CD69 receptor signaling system. The addition of glycosylation to LELTE conjugates initiated the engagement of additional receptors (such as NKR-P1) triggering significantly increased signaling caused most probably by cross-talk of the two different receptors, each equipped with its own signal amplification cascade.^{1,12}

3.4. Effect of LELTE Conjugates Glycosylation on Natural Killing. In order to evaluate the immunological activities of the tested compounds related to their potential use in tumor therapies, we followed their effect on natural killing of leukemic tumor targets. PBMC were used as a source of effector cells using effector/target (E/T) ratios from 30:1 to 300:1. Monomeric ligands **14** and **16** had little effect on natural killing or were slightly inhibitory (Figure 5, panels a and b). Dimeric ligand **15** caused an approximately 2-fold increase in natural killing, but dimeric ligand **17** was inhibitory, as were LELTE conjugates R(4Ox-2LELTE) **1** and R(4LELTE-2Ox) **3** (Figure 5c). The glycosylated LELTE conjugates R(4GalNAc-2LELTE) **2** and R(4LELTE-2GalNAc) **4** were prominent in significantly increasing natural killing, especially **4**, which increased the killing about 3-fold (Figure 5c).

High-affinity ligands for CD69 and other immune receptors, when multivalent, often initiate an extensive cross-linking of the target receptor resulting in cell hyperactivation, which may lead to activation-induced apoptosis.²³ Therefore, it appeared

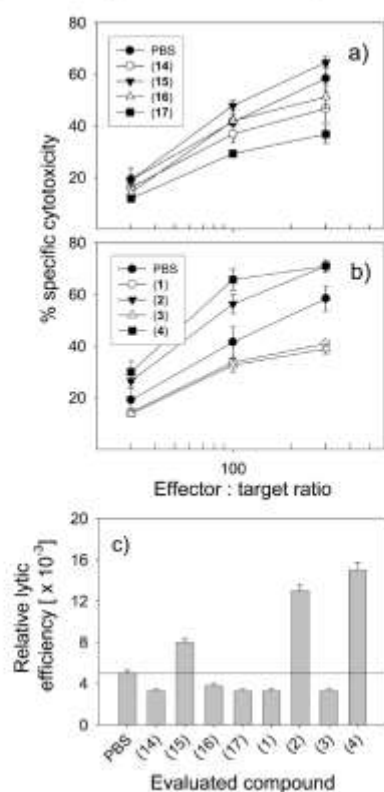


Figure 5. Natural killing of YAC-1 lymphoma tumor cells by human PBMC in the presence of tested compounds. In (a) and (b), experiments were performed in triplicate at the indicated *E/T* ratio. Values are mean \pm SD. (c) Lytic efficiency of human cells, defined as the reciprocal value of the number of lytic units.

critical to test the effect of LELTE and combined RAFTs on lymphocytes expressing varying degrees of cell surface expression of the antigen. When we tested the influence of these compounds on human lymphocytes displaying a low surface level of CD69 expression, none of the tested compounds had significant effects on these cells apart from the arsenite positive control (Figure 6, left panel). Surprisingly, however, compounds 1–4 also had very little effect on the apoptotic killing of lymphocytes with a high surface expression of CD69 (Figure 6, right panel), despite the fact that dimerized *N*-acetylhexosamine disaccharide 15, and dimerized LELTE antigen 17 had significant effects. These results were further corroborated by the apoptosis tests using DNA laddering that fully confirmed these effects (for details see Supporting Information, Figure S1). These observations greatly increase the attractiveness of LELTE RAFT conjugates for tumor therapies, in which the activation-induced apoptosis of the killer cells bearing the target receptors represents one of the major problems within the aggressive tumor microenvironment.²⁷

4. Conclusions

As summarized in Figures 5 and 6, we demonstrated for the first time that carbohydrates and immunoactive peptides may cooperate as part of a single complex RAFT-based compound in the activation of killer cells of the immune system, while at

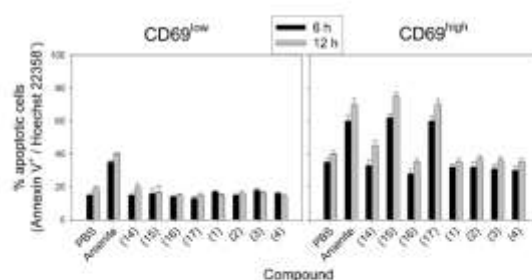


Figure 6. Effects of LELTE RAFT conjugates and control compounds on apoptosis of CD69^{low} and CD69^{high} lymphocytes using 10^{-10} M concentrations of the tested compounds. Percentage of apoptotic cells (Annexin A⁺/Hoechst 33258⁻) was measured 6 or 12 h after the addition of compounds. PBS, negative control; arsenite, positive control. The results are the means \pm standard deviations calculated from three independent determinations performed in duplicate.

the same time displaying minimal undesired effects such as activation-induced apoptosis.²¹ Before initiating complex immunological tests, the synthesized compounds were tested for their binding to the two most studied lectin-like receptors of natural killer cells, NKR-P1, and CD69 proteins.⁷ The reactivity with these receptors tested in standard plate inhibition assays was in accordance with previous knowledge on the specificity of the two receptors, clearly indicating that the two ligands, GalNAc and LELTE pentapeptide, were readily available for interaction with the target receptors, even when covalently bound to the complex RAFT scaffold. Also, the ability of the RAFT conjugates to cross-link the relevant target receptors was tested based on their ability to precipitate the soluble recombinant proteins, which is a good measure of their abilities to interact with the membrane-bound forms of the receptors. In cellular activation assays based on measurements of inositol phosphate production and the increase in the intracellular calcium levels, the combined peptide/carbohydrate RAFTs proved much more efficient compared to RAFTs substituted only with the peptide, indicating efficient cross-talk between several receptor families. In those instances where it proved difficult to correlate the plate inhibition data with receptor precipitation results and cellular activation assays, we favor the results of those assays during which the relevant receptor could work in its natural environment to those obtained recombinant bacterially produced forms of the receptor.²³ Moreover, we prefer results obtained in the precipitation assays performed under conditions more relevant to receptor biology to results coming from plate inhibition assays employing somewhat artificial evaluation system.¹³ The efficient activation of the leukocytes was paralleled in the ability of these compounds (in particular compound 4) to efficiently activate natural killing against the established cell lines with a significant (up to 3-fold) increase in specific cytotoxicity. Interestingly, at the same time the mode of presentation of the active peptide in these compounds efficiently prevented the development of critical unwanted side activities, such as activation-induced apoptosis of CD69⁺ lymphocytes that often poses a problem for efficient activators of these cells. During a natural killing assay, the cellular receptors and their ligands work in a complex network of cellular interactions that may result in killing both the tumor target and the effector lymphocyte. The primary interaction of effector lymphocyte receptors with target structures at the surface of a tumor generally results in the activation of an effector cell that is able to kill the tumor cell more efficiently, but the hyperactivation of the effector cell may also

result in its susceptibility to apoptosis and premature elimination. The *in vitro* natural killer assays described here provide evidence that cross-linking CD69 with other surface receptors specific for GlcNAc or GalNAc carbohydrates results in more efficient killing of the tumor while at the same time sparing the activated killer cells delivering the lethal attack. These results thus provide an encouraging starting point for the prospective use of these compounds in experimental tumor therapies *in vivo*.

Acknowledgment. This work was supported by the Université Joseph Fourier, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and EU ESF COST Chemistry project D-34. We thank the NanoBio Program for access to the facilities of the Chemistry Platform. Further, this work was supported by the Grants LC06010, MSM21620808, and 1M0505 from the Ministry of Education of the Czech Republic, JAA400200503 from Grant Agency of the

Academy of Sciences of the Czech Republic, 303/09/0477 and 305/09/H008 from the Czech Science Foundation, and by the Institutional Research Concept for the Institute of Microbiology (AVOZ50200510). Dr. K. Hofbauerová, Institute of Microbiology, Prague, is thanked for the preparation of soluble CD69 protein.

Supporting Information Available: Complete ref 22: Supporting Figure S1 and Supporting Methods describing apoptosis using DNA laddering; Supporting Figure S2. RP-HPLC profile of crude reaction mixture of **1** and **2** and Supporting Table 1 with MS data of **1–4** to further support the observations reported herein. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA101296T

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer des stratégies de synthèse modulables et efficaces pour obtenir des glycoclusters biologiquement actifs. Diverses évaluations biologiques ont été réalisées avec ces composés originaux au laboratoire et dans le cadre de collaborations, d'une part pour l'inhibition de différentes lectines et d'autre part pour stimuler les lymphocytes NK contre des tumeurs.

Au cours de ce travail, nous avons mis au point des stratégies de synthèse permettant d'accéder à des glycoconjugués multivalents. Les ligations chimiosélectives, éther d'oxime et cycloaddition de Huisgen catalysée par le Cu^I , utilisées lors de ces synthèses nécessitent tout d'abord la préparation de différents partenaires correctement fonctionnalisés. Le cyclodécapeptidique RAFT utilisé comme plateforme pour nos glycoclusters est obtenu par synthèse SPPS à l'échelle du gramme, et facilement fonctionnalisable régiosélectivement sur ces deux domaines d'adressage avec les fonctions réactives adéquates (aldéhyde ou azoture). Les ligands saccharidiques ont été modifiés en position anomérique pour introduire, soit une fonction oxyamine, soit une fonction propargyle. Nous avons donc synthétisé grâce à ces différents outils des molécules présentant un degré de glycosylation variable (4 à 16 copies), une géométrie variable et parfois des combinaisons saccharidiques hétérogènes. Ces méthodes de synthèse nous ont également permis de construire efficacement des molécules polyfonctionnelles contenant des peptides et des sucres. La caractérisation complète de ces composés de haut poids moléculaire par RMN et spectrométrie de masse a été menée pour confirmer leur structure et l'efficacité de nos ligations. Pour cela, il notamment a été nécessaire de mettre au point des conditions particulières de préparation des échantillons pour les analyses de MALDI-TOF.

Les études biologiques *in vitro* ont été réalisées sur les lectines ConA, UEA-1, PNA et VVA, les galectines Gal-3 et Gal-1 puis la lectine PA-IIL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats d'inhibition les plus significatifs ont été obtenus avec cette dernière. En effet, nous avons identifié un composé, RD- αFuc_{16} , capable d'inhiber l'interaction de la PA-IIL sur un polymère fucosylé de référence à des concentrations subnanomolaires. Cet inhibiteur est le plus efficace connu à ce jour.

Dans un deuxième projet, nous avons synthétisé des molécules polyfonctionnelles comportant des sucres GalNAc et des fragments peptidiques de séquence LELTE organisés de part et d'autre de la plateforme RAFT. Ces constructions ont montré des propriétés très intéressantes pour activer les cellules NK, notamment le glycoconjugué R-LELTE₄(α GalNAc)₂ qui présente une très forte affinité ($K_d = 10^{-11}$ M) pour le récepteur activateur CD69 humain. De plus, ces composés ont montré des propriétés *in vitro* de stimulation des NK et de lyse tumorale extrêmement prometteuse tout en évitant les phénomènes d'apoptose due à leur hyperstimulation. Des tests sont actuellement réalisés dans l'équipe du Pr. Kren pour évaluer les propriétés de ces composés *in vivo* pour l'immunothérapie antitumorale.

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. Les résultats prometteurs que nous avons obtenus à travers ces deux applications encouragent tout d'abord la poursuite des évaluations biologiques, notamment pour connaître l'efficacité de nos inhibiteurs à prévenir la formation du biofilm bactérien qui peut être mortel chez des patients immunodéficients. De plus, il sera intéressant de développer des nouvelles structures encore plus efficaces pour empêcher l'adhésion de la bactérie à la surface cellulaire des cellules hôtes. En effet, cette bactérie produit deux lectines solubles PA-II et PA-III qui sont respectivement spécifiques du β -D-Galactose et α -L-Fucose. De nouvelles molécules « hétérogènes » combinant des clusters de ces deux motifs saccharidiques pourraient présenter un réel potentiel anti-adhésif. Pour cela, le développement de ligations chimiques orthogonales sera nécessaire pour assembler ce type de composés.

Des travaux réalisés actuellement au laboratoire visent à développer des vaccins synthétiques antitumoraux. Au cours de projet, il a notamment été montré que des constructions multiépitopiques associant des antigènes osidiques (épitope B-dépendant), de peptides antigéniques (épitopes T-dépendants) et une queue lipidique (adjuvant) permettent d'induire des réponses immunitaires prometteuses. Les études immunologiques réalisées en collaboration avec l'Université de Californie ont en effet révélé une régression tumorale et une augmentation spectaculaire du taux de survie chez la souris, sans administration d'adjuvants externes, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces composés pour l'immunothérapie antitumorale. Sur la base de ces travaux et des résultats que nous avons obtenus avec les cellules NK, le développement d'une nouvelle génération de candidats vaccins capables à la fois de d'activer les cellules NK et les lymphocytes B et T pourrait se

révéler extrêmement intéressante. Il s'agirait dans ce cas de combiner dans la même molécule les fragments peptidiques (LELTE, épitopes T-dépendants) et des marqueurs osidiques (épitope B-dépendant) en utilisant ici encore des méthodes de ligations chimiosélectives orthogonales. Ce travail est d'ores et déjà en cours de réalisation au laboratoire.

Partie Expérimentale

PARTIE EXPERIMENTALE

General Methods. All chemical reagents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France) and were used without further purification. Progress of reactions was monitored by thin layer chromatography using silica gel 60 F₂₅₄ precoated plates (Merck). Spots were visualised by UV light and by charring with 10% H₂SO₄ in EtOH for protected derivatives or 1% ninhydrine in EtOH for Hydroxylamine derivatives. Silica gel 60 (0.063-0.2 mm or 70-230 mesh, Merck) was used for column chromatography. Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer 241 polarimeter. Melting points were measured on a Büchi melting point apparatus (model B545). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker AC400 spectrometers and chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm). Spectra were referenced to the residual proton solvent peaks relative to the signal of CDCl₃ (δ 7.27 and 77.23 ppm for ¹H- and carbon assignments were done by GCOSY and GHMQC experiments. The anomeric configuration was established from *J*_{1,2} coupling constants. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded at the University of Bern (Switzerland) by electron spray ionisation (ESI) on an Applied Biosystems/Sciex QSTAR Pulsar in the positive mode.

(1) Syntheses of linear protected peptides by SPPS

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/ tertibutyl (Fmoc/*t*Bu) protection strategy. In manual SPPS, device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12h (typically overnight) with (CH₃)₂SiCl₂ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH₂Cl₂ until complete acid trace clearance. The 2-chlorotriptyl resin was preloaded for 30 min in dry CH₂Cl₂ with *N*α-Fmoc-protected amino acid substituted at 1 mmol/g and capped with 6 mL of methanol/DIPEA/ CH₂Cl₂ (2/1/17) for 5 min and then one more time for 10 min. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with CH₂Cl₂ (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of *N*α-Fmoc-protected amino acid *in situ*

activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with CH₂Cl₂ (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by TNBS test. TNBS test required a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF, a solution of DIPEA/DMF (1:9). Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at room temperature for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

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

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

(2) General procedure for cyclization reactions

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

(3) General procedure for Alloc removal

Alloc group was removed from the crude dissolved in 20 mL of dry DCM under argon by adding PhSiH₃ (25 eq.) and then Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq.) for 1h. The solution was filtrated on C18

silica gel, the filtrate was evaporated and precipitated in ether to get after purification (5 to 100% B in 30 min) the product.

(4) General procedure for oxime ligation

Hydrated aldehyde-containing cyclopeptide and **sugar/peptide hydroxylamine** (2 eq./site) were dissolved in 0.1% TFA in H₂O (10 mM). After stirring for 1H at room temperature, analytical HPLC indicated complete conversion. The crude mixture was directly purified by preparative HPLC without additional treatment to give, after freeze-drying the glycocluster as a flocculent powder.

(5) General procedure for CuAAC ligation

The azide-containing cyclopeptide and propargyl glycosides (6 equiv.) were dissolved in a solution of *t*BuOH/AcONH₄ 100 mM buffer pH 7.4 (1:1) and the copper micropowder (0.4 equiv.) was added. After stirring 3h at room temperature for, analytical RP-HPLC indicated complete coupling reaction. The copper was removed by filtration then the crude reaction mixture was purified by preparative HPLC to remove the excess of glycosides. Glycopeptides were obtained as flocculent powders after freeze-drying.

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

Compound **2** (7.05 g, 12.71 mmol) was dissolved in a solution of acetic acid/sulfuric acid 1M (4:1, 125 mL). The solution was stirring for six hours at 90 °C. After removing solvent, the residue was dissolved in ethyl acetate. The organic layer was washed successively with aqueous solution of NaHCO₃, then water, dried over sodium sulfate and evaporated to obtain **3** (5.34 g, 78%) which used without purification. To a stirring solution in dichloromethane (20 mL) containing compound **3** (5.30 g, 9.87 mmol), *N*-hydroxyphthalimide (1.61 g, 9.87 mmol), and triethylamine (1.5 mL, 9.87 mmol) was added BF₃-Et₂O (5 mL, 39.5 mmol). The reaction was stirred at room temperature until completion (reaction monitored by thin-layer chromatography). After addition of dichloromethane (200 mL), the organic layer was washed several times with 10% aqueous sodium hydrogenocarbonate, dried under sodium sulfate, and evaporated. The alpha anomer was finally purified by silica gel chromatography

(dichloromethane/ethylacetate, 9/1) to give pure compound **4** (4.35 g, 6.3 mmol, 67 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.74–7.63 (m, 4H, Har.(Pht)), 7.37–7.10 (m, 20H, Har.(Bn)), 5.48 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, H-1), 4.81–4.33 (m, 8H, 4CH₂), 4.50 (m, 1H, H-5), 4.13–4.03 (m, 2H, H-2, H-4), 3.91 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, $J_{3,4} = 8.9\text{Hz}$, H-3), 3.81 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 3.7\text{Hz}$, $J_{6a,6b} = 11.2\text{Hz}$, H-6a), 3.61 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 1.9\text{Hz}$, $J_{6a,6b} = 11.2\text{Hz}$, H-6b); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $d = 163.6$ (C=O), 138.9 (Car.(Bn)), 138.8 (Car.(Bn)), 138.7 (Car.(Bn)), 138.2 (Car.(Bn)), 134.9 (CHar.(Pht)), 128.8 (Car.(Pht)), 128.7 (CHar.(Bn)), 128.7 (CHar.(Bn)), 128.6 (CHar.(Bn)), 128.5 (CHar.(Bn)), 128.3 (CHar.(Bn)), 128.2 (CHar.(Bn)), 128.0 (CHar.(Bn)), 128.0 (CHar.(Bn)), 127.9 (CHar.(Bn)), 127.8 (CHar.(Bn)), 123.9 (CHar.(Pht)), 104.1 (C-1), 79.7 (C-3), 75.3 (CH₂), 74.6, 74.1, 73.6 (CH₂), 73.5, 73.3 (CH₂), 72.7 (CH₂), 69.0 (C-6).

O*-α-D-mannopyranosyl-oxamine **5*

Compound **4** was dissolved in solution of methanol/dichloromethane (1/1) under hydrogen atmosphere with Pd/C 10% (0.4 eq.). After 3 hours, the Pd/C was filtered off and the solution was concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (methanol/dichloromethane, 2:8) $R_f=0.5$. The intermediate (1.45 g, 2.94 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 mannose was purified by silica gel chromatography (dichloromethane/ethanol, 7/3) to give **5** (450 mg, 2.5 mmol, 85%). ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.00 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, H-1), 4.03 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.8\text{Hz}$, H-2), 3.97 (dd, 1H, $J_{5,6} = 1.3\text{Hz}$, $J_{6,6} = 12.3\text{Hz}$, H-6), 3.88 (dd, 1H, $J_{5,6} = 3.8\text{Hz}$, H-6), 3.76–3.72 (m, 3H, H-3, H-4, H-5); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 103.9 (C-1), 73.4 (C-3), 71.2, 69.4 (C-2), 67.2, 61.4 (C-6). MS (ESI positive mode): calcd for C₆H₁₄NO₆ 196.08 [M + H]⁺, found: 195.94

O*-(2,3,6-tri-*O*-acetyl)-β-D-galactopyranosyl-*N*-oxyphtalimide **9*

To a stirring solution of compound **6** (19.5 g, 49.98 mmol) in CH₂Cl₂, 30% bromide acid in acetic anhydride was added at 0°C. After an half hour, the solution was stirred at room temperature for 3h. The organic layer was dissolved with CH₂Cl₂ and was washed successively with water, then aqueous solution of NaHCO₃, dried over sodium sulfate and

evaporated to obtain **7** (15.67 g, 74%). To a stirring solution of N-hydroxyphthalimide (6.46 g, 27.44 mmol) and tetrabutylammonium hydrogensulfate (2.61 g, 5.48 mmol) in aqueous solution of Na₂CO₃ (1M) was added a solution of compound **7** (3.26 g, 5.48 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight. After completeness of the reaction, CH₂Cl₂ was then added to the mixture and the organic layer was washed two times with water, NaCl saturated solution, dried under sodium sulfate and evaporated to obtain **9** (2.47 g, 5.02 mmol, 67%) after purification by silica gel chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 9/1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.88-7.76 (m, 4H, H_{pht}), 5.47 (dd, 1H, J_{1,2} = 8.3Hz, J_{2,3} = 10.4Hz, H-2), 5.42 (d, 1H, J_{3,4} = 3.4Hz, H-4), 5.11 (dd, 1H, H-3), 4.99 (d, 1H, H-1), 4.25-4.14 (m, 2H, H-6), 2.21, 2.19, 2.01, 1.98 (4s, 12H, 4COCH₃).

O*-β-L-galactopyranosyl oxyamine **10*

Compound **9** (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 galactose was recrystallised in pentane to give **10** as single crystals (50 mg, 0.25 mmol, 51%); ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 4.54 (d, 1H, J_{1,2} = 8.1Hz, H-1), 3.94 (d, 1H, J_{3,4} = 3.4Hz, H-4), 3.87–3.73 (m, 3H, H-5, H-6), 3.69 (dd, 1H, J_{2,3} = 9.8Hz, H-3), 3.55 (dd, 1H, H-2); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 105.9 (C-1), 73.5 (C-3), 73.2 (C-2), 69.7 (C-4), 69 (C-5), 61.4 (C-6); MS (ESI positive mode): calcd for C₈H₁₇N₂O₆ 237.10 [M + H]⁺, found: 237.00.

O*-(2, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-(1→4')-(2', 3', 6'-tri-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl)-*N*-oxyphthalimide **13*

Acetylated compound **11** (5 g, 7.37 mmol) was dissolved in DMF (7 mL) and heated at 50 °C. Hydrazine acetate (0.654 g, 8.84 mmol, 1.2 equiv) was introduced. After stirring at 50 °C during 1H, the solution was concentrated, taken up in ethyl acetate, washed with brine solution (2x30 mL), dried and concentrated to give the compound **12a** (3.53 g, 75%) as an oil. Compound **12a** (2.9 g, 4.57 mmol) was dissolved in dry THF (70 mL) and the solution was cooled at -30 °C. Diethylaminosulfur trifluoride (1.06 mL, 5.48 mmol) was then added and the solution stirred under inert gas at room temperature for 30 minutes. After addition of

methanol (5 mL) at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, the solution was concentrated and taken up with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed successively with a saturated solution of NaHCO_3 then water, dried over sodium sulfate and evaporated to get **12b** as a colorless oil (2.9 g, quantitative yield) which was used directly without further purification. To a stirring solution of compound **12b** (1.07 g, 1.67 mmol), *N*-hydroxyphthalimide (0.27 g, 1.67 mmol) and triethylamine (0.23 mL, 1.67 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) was added $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (0.8 mL, 6.68 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 1h (monitored by thin layer chromatography) and CH_2Cl_2 was added to the mixture (40 mL). The organic layer was washed two times with 10% aqueous sodium hydrogencarbonate then water, dried under sodium sulfate and evaporated. Compound **3** was finally purified by silica gel chromatography (CH_2Cl_2 -EtOAc, 4:1) and precipitation from CH_2Cl_2 -pentane to give compound **13** (1.03 g, 74%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.86–7.74 (m, 4H, Har.), 5.34 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 0.9\text{Hz}$, $J_{3',4'} = 3.3\text{Hz}$, H-4'), 5.28–5.18 (m, 2H, H-2, H-3), 5.14 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.9\text{Hz}$, H-1), 5.10 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 7.8\text{Hz}$, $J_{2',3'} = 10.4\text{Hz}$, H-2'), 4.95 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 3.3\text{Hz}$, $J_{2',3'} = 10.4\text{Hz}$, H-3'), 4.53 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.8\text{Hz}$, H-1'), 4.42 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.2\text{Hz}$, $J_{6a,6b} = 12.1\text{Hz}$, H-6a), 4.15 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 5.8\text{Hz}$, $J_{6a,6b} = 12.1\text{Hz}$, H-6b), 4.11–4.07 (m, 3H, H-4, H-6'), 3.88 (td, 1H, $J_{4',5'} = 0.9\text{Hz}$, $J_{5',6'} = 6.8\text{Hz}$, 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_3);

O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4')- β -D-glucopyranosyl-oxyamine **14*

The product **13** (1.03 g, 1.25 mmol) was deprotected by methylhydrazine using the same procedure describing for the compound **10** (277.5 mg, 0.74 mmol, 62%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.62 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.3\text{Hz}$, H-1'), 4.47 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.7\text{Hz}$, H-1), 4.03 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 1.3\text{Hz}$, $J_{6a',6b'} = 11.6\text{Hz}$, H-6a'), 3.95 (bd, 1H, $J_{3,4} = 3.1\text{Hz}$, H-4), 3.84 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 4.6\text{Hz}$, H-6b'), 3.79–3.63 (m, 7H, H-3, H-5, H-6, H-3', H-4', H-5'), 3.66 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.8\text{Hz}$, H-2), 3.38 (bd t, 1H, $J_{2',3'} = 8.4\text{Hz}$, H-2'). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 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). MS (ESI positive mode): calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NO}_{11}$ 358.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, found: 358.5.

(2,3,4-tri-*O*-acetyl)- α/β -L-fucopyranosyl fluoride **16**

Acetic acid (0.73 mL, 12.6 mmol, 1.4 eq) was added in a solution of THF (190 mL) containing ethylenediamine (0.78 mL, 10.8 mmol, 1.2 eq.). Compound **15** (3 g, 9 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 NaHCO₃, dried over sodium sulfate and evaporated to obtain the intermediate (2.17 g, 86%) as a colourless oil. Compound (2.17 g, 7.47 mmol) was dissolved in dry THF (20 mL) and the solution was cooled at -30°C. Diethylaminosulfurtrifluoride (1.08 mL, 1.44 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 CH₂Cl₂. The organic layer was washed successively with aqueous solution of NaHCO₃, 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 α **16a** and β **16b** fluorides (1.09 g, 87%).

O*-(2,3,6-tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyl)-*N*-hydroxyphthalimide **17*

Acetofluorofucose (**16**, anomeric mixture, α/β , 1/4, 490 mg, 1.68 mmol), *N*-hydroxyphthalimide (273 mg, 1.68 mmol, 1 equiv.) and triethylamine (233 μ L, 1.68 mmol, 1 equiv.) was added to a stirred suspension of 4Å molecular sieves in dry CH₂Cl₂ (5 mL). After addition of BF₃.Et₂O (850 μ L, 6.71 mmol, 4 equiv.), the solution was stirred at room temperature under argon gas. After 30 min, thin layer chromatography indicated complete disappearance of the fluoride derivative. CH₂Cl₂ (10 mL) was added, and the organic layer was washed with 10% NaHCO₃ (3 x 30 mL), which made the aqueous phase colourless, and brine (2 x 30 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting yellow oil, containing a mixture of **17** and **18**, was chromatographed (20%→40% EtOAc–pentane). It was precipitated by dropping its solution in ether into stirred pentane to give a white, amorphous solid (253 mg, 0.58 mmol, 85% (α : 35%, β =50%)); R_f = 0.46 (2:3 EtOAc–pentane); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.87-7.76 (m, 4H, H_{Ph}), 5.59 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 3.9Hz, H-1), 5.55 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.3Hz, *J*_{2,3} = 11.2Hz, H-3), 5.45 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 1.1Hz, *J*_{3,4} = 3.3Hz, H-4), 5.27(dd, 1H, *J*_{1,2} = 3.9Hz, *J*_{2,3} = 11.2Hz, H-2), 5.09 (bq, 1H, *J*_{5,CH₃} = 6.3Hz), 2.23 (s, 3H, COCH₃), 2.20 (s, 3H, COCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 1.21 (d, 3H, *J*_{CH₃,5}=6.3Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171.2 (C=O_{Ac}), 170.8 (C=O_{Ac}), 170.2 (C=O_{Ac}), 163.5 (C=O_{Ph}), 135.1 (CH_{Ph}), 129.2 (C_{Ph}), 124.1 (CH_{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 (COCH₃), 21.1

(COCH₃), 20.9 (COCH₃), 16.2 (CH₃); MS-ESI (positive mode): [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₂₁NO₁₀Na: 458.1063; found: 458.1058.

***O*-(2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -L-fucopyranosyl)-*N*-hydroxyphthalimide 18**

The compound **18** was precipitated by dropping its solution in CH₂Cl₂ into pentane (367 mg, 0.84 mmol, 85% (α : 35%, β =50%)); R_f = 0.32 (2:3 EtOAc–pentane); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.90-7.77 (m, 4H, H_{Ph}t), 5.46 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 8.3Hz, $J_{2,3}$ = 10.3Hz, H-2) 5.29-5.27 (m, 1H, H-4), 5.12 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3.4Hz, $J_{2,3}$ = 10.3Hz, H-3), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.3Hz, H-1), 3.84 (bq, 1H, $J_{4,5}$ = 6.3Hz), 2.24 (s, 3H, COCH₃), 2.23 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 1.27 (d, 3H, $J_{5,6}$ = 6.3Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171.2 (C=O_{Ac}), 170.5 (C=O_{Ac}), 170.3 (C=O_{Ac}), 163.1 (C=O_{Ph}t), 135.1 (CH_{Ph}t), 129.2 (C_{Ph}t), 124.2 (CH_{Ph}t), 106.8 (C-1), 71.4 (C-3), 70.6 (C-5), 70.1 (C-4), 67.5 (C-2), 21.2 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 16.4 (CH₃); MS-ESI (positive mode): [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₂₁NO₁₀Na: 458.1063; found: 458.1079.

***O*- α -L-fucopyranosylhydroxylamine 19**

O-(2,3,6-Tri-*O*-acetyl- α -L-fucopyranosyl)-*N*-hydroxyphthalimide **17** (520 mg, 1.20 mmol) was dissolved in EtOH (3 mL) containing methylhydrazine (3.1 mL, 60 mmol, 50 equiv.).ⁱ After stirring overnight at room temperature, the solvent was evaporated with a high vacuum pump, and the residue was stirred with absolute EtOH (2 mL) for 30-60 min at room temperature, to give pure, amorphous *O*- α -L-fucopyranosylhydroxylamine **19** (55-77%) R_f = 0.15 (EtOH/CH₂Cl₂, 3/7); ¹H NMR (CD₃OD): δ 4.86 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 4.4Hz, H-1), 3.99 (bq, 1H, $J_{5,6}$ = 6.4Hz, H-5) 3.76 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 4.0Hz, $J_{3,2}$ = 10.0Hz, H-3), 3.67-3.63 (m, 2H, H-2,H-4), 1.21 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 6.4Hz, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 104.9 (C-1), 74.5 (C-4), 72.4 (C-2), 70.5 (C-3), 68.5 (C-5), 17.4 (CH₃); MS (ESI positive mode): [M+H]⁺ calcd for C₆H₁₄NO₅, 180.0871; found, 180.0866.

***O*- β -L-fucopyranosylhydroxylamine 20**

To a stirred solution of methylhydrazine (4.58 g, 5.23 mL, 99.48 mmol) in EtOH (5.0 mL), **18** (865 mg, 1.98 mmol) was added. After stirring overnight at room temperature the solvent was evaporated under reduced pressure. The white solid obtained was suspended in absolute EtOH (10.0 mL) vigorously stirred for 30 min at rt, filtered and washed with absolute EtOH (20.0 mL) to give pure *O*- β -L-fucopyranosylhydroxylamine (**20**, 248 mg, 1.37 mmol, 70%) as white solid; R_f = 0.15 (EtOH/CH₂Cl₂, 3/7); ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 4.53 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, H-1), 3.87 (bq, 1H, $J_{5,6}$ = 6.4 Hz, H-5), 3.81-3.79 (m, 1H, H-4), 3.71 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3.3 Hz, $J_{2,3}$ = 9.6 Hz, H-3), 3.55 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, $J_{2,3}$ = 9.6 Hz, H-2), 1.33 (d, 3H, $J_{5,6}$ = 6.4 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 105.9 (C-1), 73.4 (C-3), 71.7 (C-4), 71.2 (C-5), 69.5 (C-2), 15.7 (CH₃); MS (ESI positive mode): [M+H]⁺ calcd for C₆H₁₄NO₅, 180.0871; found, 180.0875

3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactopyranosyl nitrate 22

The glycosylbromide **7** (11.6 g, 27 mmol) was dissolved in acetone (54 mL). After addition of saturated sodium monobasic phosphate solution (108 mL), zinc powder (22 g, 90 mmol, 4 equiv.) was introduced. After one hour and half under strong agitation, the solution was filtered, extracted by ethyl acetate (3x100 mL). The combined organic layers were washed successively by water, saturated sodium bicarbonate solution, brine, dried on magnesium sulfate, concentrated to get the compound **21** (5.22 g, 19.2 mmol, 71%) as white syrup.

Triacetylated galactal **21** (5.22 g, 19.2 mmol) was dissolved in acetonitrile (250 mL). At -15 °C, sodium azide (3.74 g, 57.5 mmol, 3 equiv.) and cerium ammonium nitrate (31.56 g, 57.5 mmol, 31.56 g) was introduced. After strong agitation during 1h30, cold water (100 mL) was adjusted slowly and the solution was extracted by cold ether. The combining organic layers were dried, concentrated as yellow syrup directly purified by chromatography column (DCM: EtOAc, 9:1) to give the pure compound **22** (5.4 g, 14.36 mmol, 72%).

3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranosyl fluoride 2

Under inert gas, the compound **22** (4.36 g, 13.2 mmol) was dissolved in dry THF (116 mL) and the solution was cooled at -30 °C. Diethylaminosulfur trifluoride (2.08 mL, 15.8 mmol) was then added, and the solution was stirred at room temperature during 30 min. After addition of methanol (10 mL) at -30°C, the solution was concentrated and taken up with dichloromethane. The organic layer was washed successively with saturated solution of NaHCO₃ then water, dried over sodium sulfate, and evaporated to get the compound **23** (4.30 g, 97%) as a colorless oil; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.71 (dd, 1H, $J_{1\alpha,2\alpha} = 2.6\text{Hz}$, $J_{1\alpha,F} = 52.2\text{Hz}$, H-1 α), 5.48 (dd, $J_{4\alpha,5\alpha} = 1.2\text{Hz}$, $J_{3\alpha,4\alpha} = 3.2\text{Hz}$, H-4 α), 5.36-5.34 (m, 1H, H-3 α), 5.32 (td, $J_{4\beta,5\beta} = 1.1\text{Hz}$, $J_{3\beta,4\beta} = 3.3\text{Hz}$, H-4 β), 5.09 (dd, 1H, $J_{1\beta,2\beta} = 7.5\text{Hz}$, $J_{1\beta,F} = 51.8\text{Hz}$, H-1 β), 4.83 (ddd, 1H, $J_{3\beta,F} = 0.8\text{Hz}$, $J_{3\beta,4\beta} = 3.3\text{Hz}$, $J_{2\beta,3\beta} = 10.9\text{Hz}$, H-3 β), 4.36 (td, 1H, $J_{4\alpha,5\alpha} = 1.2\text{Hz}$, $J_{5\alpha,6\alpha} = 6.4\text{Hz}$, H-5 α), 4.17-4.06 (m, 2H, H-6 α , H-6 β), 3.96 (bt, $J_{5\beta,6\beta} = 6.3\text{Hz}$, H-5 β), 3.78 (ddd, 1H, $J_{1\beta,2\beta} = 7.5\text{Hz}$, $J_{2\beta,3\beta} = 10.9\text{Hz}$, $J_{1\beta,F} = 12.7\text{Hz}$, H-2 β), 3.78-3.68 (m, 1H, H-2 α), 2.13-2.01 (6s, 18H, 6COCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (C=O_{Ac}), 170.3 (C=O_{Ac}), 170.2 (C=O_{Ac}), 170 (C=O_{Ac}), 169.6 (C=O_{Ac}), 108.3 (d, $J_{C-1\beta,F} = 217\text{Hz}$, C-1 β), 106.2 (d, $J_{C-1\alpha,F} = 224\text{Hz}$, C-1 α), 71.6 (C-5 β), 71.0 (d, $J_{C-3\beta,F} = 11\text{Hz}$, C-3 β), 69.5 (C-5 α), 68.5 (C-3 α), 67.2 (C-4 α), 66.3 (C-4 β), 61.8 (C-6 α), 61.5 (C-6 β), 61.2 (d, $J_{C-2\beta,F} = 24\text{Hz}$, C-2 β), 57.8 (d, $J_{C-2\alpha,F} = 24\text{Hz}$, C-2 α), 21.0 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.8 (COCH₃).

***O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranosyl)-*N*-oxyphthalimide 24**

To a stirring solution in dichloromethane (200 mL) containing compound **23** (4.30 g, 13.0 mmol), *N*-hydroxyphthalimide (2.12 g, 13.0 mmol), and triethylamine (1.81 mL, 13.0 mmol) was added BF₃-Et₂O (3.52 mL, 65.0 mmol). The reaction was stirred at room temperature until completion (reaction monitored by thin-layer chromatography). After addition of dichloromethane (200 mL), the organic layer was washed several times with 10% aqueous sodium hydrogenocarbonate, dried under sodium sulfate, and evaporated. The alpha and beta anomers were finally separated by silica gel chromatography (dichloromethane/ethylacetate, 9/1) to give pure compound **24** (2.35 g, 4.72 mmol 88% ($\alpha=38\%$, $\beta=50\%$)) after crystallization from diethyl ether/pentane; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.85-7.75 (m, 4H, Har.), 5.57 (bd, 2H, $J_{1,2} = J_{3,4} = 3.4\text{Hz}$, H-1, H-4), 5.47 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.4\text{Hz}$, $J_{2,3} = 11.3\text{Hz}$, H-3), 5.17 (bt, 1H, $J_{5,6\alpha} = 6.4\text{Hz}$, H-5), 4.23 (dd, 1H, $J_{5,6\alpha} = 6.4\text{Hz}$, $J_{6\alpha,6\beta} = 11.3\text{Hz}$, H-6 α), 3.97-

3.92 (m, 2H, H-2,H-6b), 2.14, 2.06, 2.02 (3s, 9H, 3OCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.8 (C=O_{Ac}), 170.3 (C=O_{Ac}), 169.9 (C=O_{Ac}), 163.3 (C=OPht), 135.2 (CHar.), 129.1 (Car.), 124.2 (CHar.), 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 (OCOCH₃); MS (ESI positive mode): calcd for C₂₀H₁₉N₄O₁₀-Na: 498.09 [M + Na]⁺, found: 497.96.

***O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-*N*-oxyphthalimide 25**

To compound 24 (1.68 g, 3.5 mmol) dissolved in a solution of methanol/acetic anhydride (9/1, 40 mL) was added Pd/C 10% (0.38 g, 0.3 mmol). The mixture was stirred at room temperature under an atmosphere of hydrogen for 1h. The catalyst was then removed by filtration under Celite and washed with methanol. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was finally purified by silica gel chromatography (dichloromethane/ethyl acetate, 4/1 then pure ethyl acetate) to afford *N*-acetylated derivative (0.92 g, 63%) as a white powder after precipitation from dichloromethane/diethyl ether; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86-7.77 (m, 4H, Har.), 6.07 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 9.6Hz, NH), 5.54 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3.0Hz, H-4), 5.38 (d, 1H, *J*_{1,2} = 3.4Hz, H-1), 5.34 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.0Hz, *J*_{2,3} = 11.3Hz, H-3), 5.08 (bt, 1H, *J*_{5,6} = 6.4Hz, H-5), 4.80 (ddd, 1H, *J*_{1,2} = 3.4Hz, *J*_{2,NH} = 9.6Hz, *J*_{2,3} = 11.3Hz, H-2), 4.30 (dd, 1H, *J*_{5,6} = 6.4Hz, *J*_{6a,6b} = 11.3Hz, H-6a), 4.00 (dd, 1H, *J*_{5,6} = 6.4Hz, *J*_{6a,6b} = 11.3Hz, H-6b), 2.18, 2.12, 2.09, 2.04 (4s, 12H, 3OCOCH₃, NHCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171.2 (C=O_{Ac}), 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(OCOCH₃).

***O*- α -D-galactopyranosyloxyamine NHAc 25**

The compound (0.86 g, 1.7 mmol) was dissolved in a solution of ethanol/methylhydrazine (1/1, 10 mL) and stirred at room-temperature overnight. After evaporation of the mixture, the residue was purified by flash silica gel chromatography (dichloromethane/ethanol, 7/3 then pure ethanol) to obtain the pure aminooxylated product 25 (0.37 g, 1.56 mmol, 90%) as a white powder. ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 4.99 (d, 1H, *J*_{1,2} = 4.1Hz, H-1), 4.24 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 4.1Hz, *J*_{2,3} = 11.3Hz, H-2), 4.03-3.99 (m, 2H, H-4, H-5), 3.89-3.76 (m, 3H, H-3, H-6), 2.08 (s, 3H, HNCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 175.0 (HNCOCH₃), 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 (H₂COCH₃); ESI-MS (positive mode): calcd for C₈H₁₇N₂O₆ 237.10 [M + H]⁺, found: 237.1.

O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3')-(4',6'-di-*O*-acetyl-2'-azido-2'-desoxy-D-galactopyranosyl)-*N*-oxyphthalimide **32*

A solution of **30** (1.5 g, 2.33 mmol) in THF (20 ml) was treated with DAST (0.46 ml, 1.5 equiv.) at -30 °C. The mixture was warmed to room temperature and stirred until TLC indicates complete disappearance of the starting material **1** (2H). After addition of CH₃OH (2 ml) at -30 °C, the solution was evaporated to dryness. The yellowish syrup was dissolved in CH₂Cl₂ (20 ml), washed successively with saturated solution of NaHCO₃, then water and the organic layer was dried over Na₂SO₄. After evaporation to dryness, the resulting crude fluoride derivative **31** (*R_f* = 0.23, eluent: CH₂Cl₂/AcOEt, 4/1) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (20 ml). *N*-hydroxyphthalimide (0.38 g, 1 equiv.), triethylamine (0.33 ml, 1 equiv.) and BF₃·Et₂O (1.2 ml, 4 equiv.) were added and the solution was stirred for 1 h at room temperature. CH₂Cl₂ (20 ml) was then added to the crude mixture. The organic layer was washed twice with 10% NaHCO₃ and water, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The α -anomer **32** was finally purified by silica gel chromatography (eluent: ether) and precipitated from CH₂Cl₂/pentane as a white amorphous solid. 0.73 g (41% yield from **1**); *R_f* = 0.45 (eluent: ether); mp = 103.4–105.7 °C; [α]₂₅^D = 45.7 (c 0.96, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86–7.74 (m, 4H, Har.), 5.63 (bd, 1H, ³*J*_{3',4'} = 3.1 Hz, H-4'), 5.59 (d, 1H, ³*J*_{1',2'} = 3.8 Hz, H-1'), 5.36 (bd, 1H, ³*J*_{3,4} = 3.3 Hz, H-4), 5.19 (dd, 1H, ³*J*_{1,2} = 7.8 Hz, ³*J*_{2,3} = 10.4 Hz, H-2), 5.02 (dd, 1H, ³*J*_{5',6a'} = 4.3 Hz, ³*J*_{5',6b'} = 7.3 Hz, H-5'), 5.00 (dd, 1H, H-3), 4.75 (d, 1H, H-1), 4.34 (dd, 1H, ²*J*_{6a',6b'} = 11.7 Hz, H-6a'), 4.26 (dd, 1H, ³*J*_{2',3'} = 11.0 Hz, H-3'), 4.16 (dd, 1H, ³*J*_{5,6a} = 6.7 Hz, ²*J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H, ³*J*_{5,6b} = 6.1 Hz, H-6b), 3.96 (dd, 1H, H-2'), 3.95–3.91 (m, 1H, H-5), 3.83 (dd, 1H, H-6b'), 2.14, 2.12, 2.06, 2.05, 2.02, 1.97 (6s, 18H, 6 \times OCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.9 (C O), 170.8 (C O), 170.6 (C O), 170.4 (C O), 169.9 (C O), 169.8 (C O), 163.3 (C O), 135.2 (CHar.), 129.1 (Car.), 124.1 (CHar.), 103.5 (C-1), 101.9 (C-1), 74.7 (C-3'), 71.4 (C-5), 71.2, 70.2 (C-3, C-5'), 69.8 (C-4'), 69.2 (C-2), 67.3 (C-4), 62.8 (C-6'), 61.6 (C-6), 59.2 (C-2'), 21.1 (CH₃), 21.0 (CH₃), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃); MS-ESI (positive mode): calcd for C₃₂H₃₆N₄O₁₈Na: 787.1922 [M+Na]⁺, found: 787.1933. The corresponding β -anomer was also recovered. 0.56 g (31% yield from **1**); *R_f* = 0.24 (eluent: ether); mp = 104.6–107.1 °C; [α]₂₅^D = 110.4 (c 0.95, CHCl₃); ¹H NMR (300

MHz, CDCl₃): δ 7.90–7.76 (m, 4H, Har.), 5.36 (bd, 2H, $^3J_{3,4} = 3.4\text{Hz}$, $^3J_{3',4'} = 3.4\text{Hz}$, H-4,H-4'), 5.15 (dd, 1H, $^3J_{1,2} = 7.8\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 10.5\text{Hz}$, H-2), 5.01 (dd, 1H, H-3), 4.91 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 8.4\text{Hz}$, H-1'), 4.77 (d, 1H, H-1), 4.15–4.05 (m, 4H, H-6,H-6'), 3.90 (dd, 1H, $^3J_{2',3'} = 10.1\text{Hz}$, H-2'), 3.88 (bt, 1H, $^3J_{5,6b} = 5.7\text{Hz}$, H-5), 3.76 (t, 1H, $^3J_{5',6'} = 6.2\text{Hz}$, H-5'), 3.63 (dd, 1H, H-3'), 2.15, 2.14, 2.09, 2.03, 1.97, 1.94 (6s, 18H, 6 \times OCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (C O), 170.6 (C O), 170.5 (C O), 170.1 (C O), 169.7 (C O), 163.0 (C O), 135.2 (CHar.), 129.1 (Car.), 124.2 (CHar.), 106.2 (C-1'), 101.8 (C-1), 77.3 (C-3'), 72.5 (C-5'), 71.3 (C-5), 71.0 (C-3), 69.1 (C-2), 67.9, 67.2 (C-4, C-4'), 61.9, 61.8 (C-6, C-6'), 61.5 (C-2'), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃); DCI⁺-MS (NH₃ + isobutane): m/z 782.0 [M + NH₄]⁺.

***O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3')-(2'-acetamido-2'-deoxy-4',6'-di-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-*N*-hydroxyphthalimide**

Compound **32** (0.73 g, 0.96 mmol) was dissolved in a degassed solution of CH₃OH/Ac₂O (9/1, 30 ml) containing 10% Pd/C (0.2 g, 0.3 equiv.). The mixture was stirred for 3h at room temperature under H₂ before removing the catalyst by filtration over a pad of celite. After evaporation, the compound was purified by silica gel chromatography (eluent: EtOAc), then precipitated in CH₂Cl₂/pentane as a white amorphous solid (0.34 g, 0.42 mmol, 45%); R_f = 0.38 (eluent: AcOEt); $[\alpha]_{25}^D$ 120.5 (*c* 0.82, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.85–7.76 (m, 4H, Har.), 6.14 (d, 1H, $^3J_{2',\text{NH}} = 9.5\text{Hz}$, NH), 5.55 (bd, 1H, $^3J_{3',4'} = 2.6\text{Hz}$, H-4'), 5.37 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.6\text{Hz}$, H-1'), 5.36 (bd, 1H, $^3J_{3,4} = 2.8\text{Hz}$, H-4), 5.14 (dd, 1H, $^3J_{1,2} = 7.7\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 10.3\text{Hz}$, H-2), 4.99–4.94 (m, 2H, H-3, H-5'), 4.78 (ddd, 1H, $^3J_{2',3'} = 11.3\text{Hz}$, H-2'), 4.66 (d, 1H, H-1), 4.37 (dd, 1H, $^3J_{5',6a'} = 4.7\text{Hz}$, $^3J_{6a',6b'} = 11.6\text{Hz}$, H-6a'), 4.20–4.09 (m, 3H, H-3', H-6), 3.94–3.87 (m, 2H, H-5, H-6a'), 2.17 (s, 3H, OCOCH₃), 2.16, (s, 3H, NHCOCH₃), 2.15, 2.11, 2.08, 2.06, 1.97 (5s, 15H, 5OCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171.1 (C O), 170.8 (C O), 170.7 (C O), 170.5 (C O), 170.3 (C O), 169.9 (C O), 163.5 (C O), 135.3 (CHar.), 129.0 (Car.), 124.2 (CHar.), 105.9 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.9 (C-2'), 72.5 (C-3'), 71.3 (C-5), 71.1, 70.2 (C-3, C-5'), 69.3 (C-4'), 68.9 (C-2), 67.2 (C-4), 62.8 (C-6'), 61.6 (C-6), 23.7 (CH₃), 21.2 (CH₃), 21.1 (CH₃), 20.9 (CH₃); MS (ESI positive mode): calcd for C₃₄H₄₀N₂O₁₉Na: 803.2123 [M + Na]⁺, found: 803.2117.

***O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3')-2'-acetamido-2'-deoxy- α -D-galactopyranosyl
hydroxylamine **33****

The intermediate (55 mg, 0.07 mmol) was dissolved in EtOH (2 ml) containing methylhydrazine (0.3 ml, 80 equiv.). After stirring for 4H at room temperature, the solvent was evaporated to dryness. The fully deprotected compound **32** was purified by precipitation in CH₃OH/CH₂Cl₂, then lyophilization (20 mg, 0.05 mmol, 72%); $[\alpha]_{25}^D = 93.9$ (*c* 0.6, H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 4.95 (d, 1H, ³*J*_{1',2'} = 4.0Hz, H-1'), 4.45 (d, 1H, ³*J*_{1,2} = 7.7Hz, H-1), 4.39 (dd, 1H, ³*J*_{2',3'} = 11.4Hz, H-2'), 4.24 (bd, 1H, ³*J*_{3',4'} = 2.8Hz, H-4'), 4.02 (bt, 1H, ³*J*_{5',6'} = 6.3Hz, H-5'), 3.97 (dd, 1H, H-3'), 3.91 (bd, 1H, ³*J*_{3,4} = 3.2Hz, H-4), 3.80–3.72 (m, 4H, H-6, H-6'), 3.66–3.64 (m, 1H, H-5), 3.61 (dd, 1H, ³*J*_{2,3} = 9.9Hz, H-3), 3.50 (dd, 1H, H-2), 2.03 (s, 3H, NHCOCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 175.0 (C O), 105.0 (C-1), 101.1 (C-1'), 77.3 (C-3'), 75.3 (C-5), 72.9 (C-3), 71.1, 70.9 (C-2, C-5'), 69.1, 68.9 (C-4, C-4'), 61.5, 61.3 (C-6, C-6'), 48.2 (C-2'), 22.3 (CH₃); MS (ESI positive mode): calcd for C₁₄H₂₆N₂O₁₁Na: 421.1434 [M + Na]⁺; found: 421.1435.

2-propynyl-2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside **34**

To a solution of β -D-galactopyranose pentaacetate **6** (1 g, 2.56 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ was added freshly distilled propargyl alcohol (3.8 eq., 0.565 mL, 9.72 mmol) and BF₃·Et₂O (2.5 eq., 0.811 mL, 6.4 mmol) at 0°C and the reaction mixture was allowed to reach room temperature for 16h. The solution was treated with an excess of Et₃N and stirring was continued during few minutes, diluted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with NaHCO₃ saturated solution (2x50 mL), dried MgSO₄, and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with cyclohexane-AcOEt (3:2) to afford **34** (0.840, 2.17 mmol, 85%); *R*_f=0.5 (cyclohexane-AcOEt (3:2)); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.39 (Br dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.4Hz, *J*_{4,5} = 1Hz, H-4), 5.15 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 7.9Hz, *J*_{2,3} = 10.4Hz, H-2), 4.99 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 10.4Hz, *J*_{3,4} = 3.4Hz, H-3), 4.7 (d, 1H, *J*_{1,2} = 7.9Hz, H-1), 4.3 (d, 2H, *J*_{CH₂, CH} = 2.4Hz, CH₂-C \equiv CH), 4.11 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.9 (td, 1H, *J*_{4,5} = 1Hz, *J*_{5,6} = 6.6Hz, H-5), 2.46 (t, 1H, *J*_{CH₂, CH} = 2.4Hz, CH₂-C \equiv CH), 2.08, 2, 1.98, 1.92 (4s, 12H, 4COCH₃).

2-propynyl-2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranoside 33

The compound **33** was obtained following the procedure of synthesis of **34** (0.387 mg, 0.896 mmol, 70%); ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.26 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.4\text{Hz}$, $J_{3,4} 10.0\text{Hz}$, H-3), 5.21 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, $J_{2,3} = 3.4$, H-2), 4.95 (d, 1H, $J_{1,2} 1.7\text{Hz}$, H-1), 4.24 (dd, 2H, $J_{6a,6b} = 5.2\text{Hz}$, $J_{5,6} = 12.2\text{Hz}$, H-6a, H-6b), 4.24 (d, 2H, $J_{\text{H,H}} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.00 (dd, 1H, H-5), 2.44 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 2.09, 2.04, 1.97, 1.94 ppm (4 x s, 12H, CH_3);

2-propynyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α/β -D-fucopyranoside 35

The compound **35** was obtained following the procedure of synthesis of **34** (0.44 mg, 1.34 mmol, 60%) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.29 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.8\text{Hz}$, $J_{3,4} = 3.3\text{Hz}$, H-3), 5.21 (br dd, 1H, $J_{3,4} = 3.3\text{Hz}$, $J_{4,5} = 1\text{Hz}$, H-4), 5.18 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7\text{Hz}$, H-1), 5.05 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.7\text{Hz}$, $J_{2,3} = 10.8\text{Hz}$, H-2), 4.2 (d, 2H, $J = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.08-4.02 (q, 1H, $J_{5,6} = 6.4\text{Hz}$, H-5), 2.36 (t, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 2.09, 2.02, 1.91 (3s, 9H, 3COCH_3), 1.08 (d, 3H, $J_{\text{CH}_3,5} = 6.5\text{Hz}$, CH_3).

2-propynyl-2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-lactopyranoside 36

The compound **36** was obtained following the procedure of synthesis of **34** (78%) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.35 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, H-1), 5.16 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.8\text{Hz}$, H-2), 5.03 (dd, 1H, $J_{5,6} = 1.3\text{Hz}$, $J_{6,6} = 12.3\text{Hz}$, H-6), 4.7 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.8\text{Hz}$, H-1), 4.3 (d, 2H, $J_{5,6} = 3.8\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.11 (m, 3H, H-6), 3.9 (t, 1H, x), 2.46 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 2.15-1.98 (4s, 12H, 4COCH_3).

Prop-2-ynyl- β -D-galactopyranoside 38

To a solution of **34** in dry methanol, a solution of sodium methoxide (25 % in MeOH) was added until pH=8-9. This was stirred at room temperature for 3Hours followed by addition of Amberlite IR-3 and stirred until pH=6 during 10 minutes. After filtration, this was concentrated to yield **38** as a white solid (438 mg, 2.17 mmol, quantitative); ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 4.53 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.91\text{Hz}$, H-1), 4.43 (br t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 3.88 (d, 1H, $J_{3,4} = 3.3\text{Hz}$, H-4), 3.78-3.58 (m, 4H, H-3, H-5, H-6), 3.49 (dd, 1H, $J_{1,2} = 7.91\text{Hz}$, $J_{2,3} =$

9.72Hz, H-2), 2.87 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): $\delta = 101.2$ (C-1), 76.2 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 75.3 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 72.7 (C-5), 70.5 (C-4), 68.6 (C-3), 60.9 (C-6), 56.5 (OCH_2), 48.9 (C-2);

Prop-2-ynyl- α -D-mannopyranoside 39

The compound **39** was obtained following the conditions described for **38** (68 mg, 0.336 mmol, quantitative) ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 4.98 (s, 1H, H-1), 4.29 (br t, 2H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 3.90 (br d, 1H, H-2), 3.87-3.81 (br d, 1H, H-5), 3.79-3.70 (m, 2H, H-3, H-4), 3.67-3.57 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.87 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 98.8 (C-1), 78.9 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 76.2 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 73.1 (C-5), 70.47 (C-4), 69.9 (C-3), 66.6 (C-6), 60.8 (OCH_2), 54.5 (C-2);

Prop-2-ynyl- α -D-fucopyranoside 40

The compound **40** was obtained following the conditions described for **38** (100 mg, 2.17 mmol, quantitative) ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 4.98 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.5\text{Hz}$, H-1), 4.29 (t, 2H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.06 (q, 1H, $J_{\text{CH}_3,5} = 6.6\text{Hz}$, H-5), 3.82-3.72 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 2.87 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 1.17 (d, 3H, $J_{\text{CH}_3,5} = 6.6\text{Hz}$, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 100.2 (C-1), 81.7 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 78.4 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 74.4 (C-5), 72.1 (C-4), 70.3 (C-3), 69.7 (OCH_2), 57.58 (C-2), 17.7 (CH_3).

Prop-2-ynyl- β -D-lactopyranoside 41

The compound **41** was obtained following the conditions described for **38** ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 4.62 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.91\text{Hz}$, H-1), 4.29 (br t, 2H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.40 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.85\text{Hz}$, H-1'), 3.98-3.86 (m, 2H), 3.80-3.46 (m, 9H), 2.87 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.4\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 103.6, 101.0, 79.4, 78.9, 77.0, 76.0, 75.5, 75.0, 73.3, 73.2, 71.6, 69.2, 61.7, 60.6, 57.3.

Linear R-(Boc)₄ 42

The linear decapeptide was assembled on Gly-SASRIN® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide **42** was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (0.59 mmol, 84%); analytical RP-HPLC: R_t = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min); MS (ESI positive mode): Calcd for C₆₄H₁₁₂N₁₄O₁₉ *m/z* 1380.1 [M+H]⁺, found *m/z* 1381.7.

R-(Boc)₄ 43

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **42** (1111 mg, 0.82 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide **43** as a white solid powder (1111 mg, 0.82 mmol). This crude material was used without further purification. analytical RP-HPLC: R_t = 9.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min); MS (ESI positive mode): Calcd for C₆₄H₁₁₀N₁₄O₁₈ *m/z* 1362.0 [M+H]⁺, found *m/z* 1363.1.

R-(BocSertBu)₄ 43a

The cyclised peptide was dissolved in 100 mL of TFA/CH₂Cl₂ (1:1) solution. The reaction mixture was stirred during 1h at room temperature. The product was concentrated and precipitated from Et₂O afforded peptide R(**4NH₂**) (yield: quantitative, 0.52 mmol). The peptide was dissolved in DMF (52 mL, c = 10⁻² mol/L) with the amino acid BocSer(tBu)OH (598 mg, 2.29 mmol) and the coupling reagent PyBOP (1190 mg, 2.29 mmol). The pH was adjusted by addition of DIPEA (435 μL, 2.29 mmol). After 2H, the peptide **43b** was concentrated, precipitated with diethyl ether. analytical RP-HPLC: R_t = 12.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min); MS (ESI positive mode): Calcd for C₉₂H₁₆₂N₁₈O₂₆ *m/z* 1937.2 [M+H]⁺, found *m/z* 1937.2.

R-(4COCHO) 45

The peptide **43b** was dissolved in 100 mL of TFA/CH₂Cl₂ (1:1) solution. The reaction mixture was stirred during 1h at room temperature. The product was concentrated and precipitated from Et₂O afforded peptide **44** (yield: quantitative). Peptide **x** (35.8 mg, 27.3 μmol) and 40 eq. of NaIO₄ (235 mg, 1.1 mmol) were dissolved in water at 10⁻²M. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide **45** as a white powder (23.5 mg, x μmol, 73%) analytical RP-HPLC: R_t = 9.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 30 min); MS (ESI positive mode): Calcd *m/z* 1186.0 [M+H]⁺, found *m/z* 1187.6.

R-βGal₄ **46a**

The compound **46a** (5 mg, 2.63 mmol) was obtained following general procedure (**4**); analytical RP-HPLC: R_t = 6 min (C₁₈, 214 nm, 5-40% B in 15 min); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.79-7.74 (m, 4H, 4×H_{ox}), 5.09-5.00 (m, 4H, 4×H1), 4.67-4.56 (m, 2H, 2×H_{αLys}), 4.44-4.22 (m, 6H, 6×H_{αLys,Pro,Ala}), 4.05 (d, 2H, ²J_{Hα,Hα'} = 17.6Hz, 2×H_{αGly}), 3.95-3.91 (m, 4H, 4×H4), 3.96-3.67 (m, 26H, 4×H2, 4×H3, 4×H5, 8×H6, 2×H_{α'Gly}, 4×H_{δPro}), 3.32-3.12 (m, 8H, 4×CH_{2εLys}), 2.30-2.18 (m, 2H, 2×H_{βPro}), 2.11-1.17 (m, 36H, 4×CH_{2βLys}, 4×CH_{2δLys}, 2×H_{βPro}, 2×CH_{2γPro}, 2×CH_{3Ala}, 8×H_{γLys}); MS (ESI positive mode): Calcd for C₇₆H₁₂₂N₁₈O₃₈ *m/z* 1895.92 [M+H]⁺, found: *m/z* 1896.8.

R-αMan₄ **46b**

Compound **46b** (4.3 mg, 2.26 mmol, 53%) was obtained following general procedure (**4**) than to obtain **46a**. analytical RP-HPLC: R_t = 6 min (C₁₈, 214 nm, 5-40% B in 15 min); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.79-7.74 (m, 4H, 4×H_{ox}), 5.49 (s, 4H, 4×H1), 4.67-4.56 (m, 2H, 2×H_{αLys}), 4.44-4.22 (m, 6H, 6×H_{αLys,Pro,Ala}), 4.11-4.01 (m, 6H, 4×H-2, 2×H_{αGly}), 3.95-3.91 (m, 4H, 4×H4), 3.90-3.54 (m, 26H, 4×H-3, 4×H-4, 4×H-5, 8×H-6, 2×H_{α'Gly}, 4×H_{δPro}), 3.32-3.12 (m, 8H, 4×CH_{2εLys}), 2.30-2.18 (m, 2H, 2×H_{βPro}), 2.11-1.17 (m, 36H, 4×CH_{2βLys}, 4×CH_{2δLys}, 2×H_{βPro}, 2×CH_{2γPro}, 2×CH_{3Ala}, 8×H_{γLys}); MS (ESI positive mode): Calcd for C₇₆H₁₂₂N₁₈O₃₈ *m/z* 1895.92[M +H]⁺, found: *m/z* 1896.8.

R- α Fuc₄ 46c

Compound **46c** (5.1 mg, 2.78 mg, 66%) was obtained following general procedure (4) than to obtain **46a**; analytical RP-HPLC: $R_t = 7.8$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 15 min); ^1H NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.76\text{-}7.72$ (m, 4H, $4\times\text{H}_{\text{ox}}$), $5.56\text{-}5.48$ (m, 4H, $4\times\text{H}_1$), $4.67\text{-}4.6$ (m, 2H, $2\times\text{H}_{\alpha\text{Lys}}$), $4.36\text{-}4.21$ (m, 6H, $6\times\text{H}_{\alpha\text{Lys,Pro,Ala}}$), $4.08\text{-}3.95$ (m, 6H, $4\times\text{H}_5$, $2\times\text{H}_{\alpha\text{Gly}}$), $3.96\text{-}3.67$ (m, 16H, $4\times\text{H}_2$, $4\times\text{H}_3$, $4\times\text{H}_4$, $2\times\text{H}_{\alpha'\text{Gly}}$, $2\times\text{H}_{\delta\text{Pro}}$), $3.66\text{-}3.51$ (m, 2H, $2\times\text{H}_{\delta\text{Pro}}$), $3.32\text{-}3.12$ (m, 8H, $4\times\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), $2.30\text{-}2.18$ (m, 2H, $2\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), $2.11\text{-}1.17$ (m, 36H, $4\times\text{CH}_{2\beta\text{Lys}}$, $4\times\text{CH}_{2\delta\text{Lys}}$, $2\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$, $2\times\text{CH}_{2\gamma\text{Pro}}$, $2\times\text{CH}_3\text{Ala}$, $8\times\text{H}_{\gamma\text{Lys}}$), $1.17\text{-}1.08$ (m, 12H, $4\times\text{CH}_3\text{Fuc}$); MS (ESI positive mode): Calcd for $\text{C}_{76}\text{H}_{122}\text{N}_{18}\text{O}_{34}$ m/z 1831.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 1832.9.

R- β Fuc₄ 46d

Compound **46d** (5 mg, 2.6 mmol, 65%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: $R_t = 7.4$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 15 min); MS (ESI positive mode): Calcd for $\text{C}_{76}\text{H}_{122}\text{N}_{18}\text{O}_{34}$ $m/z = 1831.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 1832.9.

R- α Tn₄ 46e

Compound **46e** (7.1 mg, 3.44 mmol, 87%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: $R_t = 8.66$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 20 min); MS (ESI positive mode): Calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{135}\text{N}_{22}\text{O}_{38}$ m/z 2061.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 2061.1. ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.73 (s, 2H, H_{ox}), 7.71 (s, 2H, H_{ox}), $5.56\text{-}5.52$ (m, 4H, $4\times\text{H}_1$), $4.66\text{-}4.59$ (m, 2H, $2\times\text{H}_{\alpha\text{Lys}}$), $4.40\text{-}4.24$ (m, 10H, $2\times\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$, $2\times\text{H}_{\alpha\text{Lys}}$, $2\times\text{H}_{\alpha\text{Pro}}$, $4\times\text{H}_2$), $4.11\text{-}3.88$ (m, 14H, $4\times\text{H}_{\alpha\text{Gly}}$, $1\times\text{CH}_{2\delta\text{Pro}}$, $4\times\text{H}_4$, $4\times\text{H}_3$), $3.88\text{-}3.43$ (m, 14H, $1\times\text{CH}_{2\delta\text{Pro}}$, $4\times\text{H}_6$, $8\times\text{H}_6$), $3.32\text{-}3.12$ (m, 8H, $4\times\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), $2.33\text{-}2.21$ (m, 2H, $2\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), $2.10\text{-}1.22$ (m, 48H, $4\times\text{CH}_3\text{NHAc}$, $4\times\text{CH}_{2\beta\text{Lys}}$, $4\times\text{CH}_{2\delta\text{Lys}}$, $2\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$, $2\times\text{CH}_{2\gamma\text{Pro}}$, $4\times\text{CH}_{2\gamma\text{Lys}}$, $2\times\text{CH}_3\text{Ala}$); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O): δ 174.9, 174.6, 174.6, 174.1, 173.2, 171.6, 171.46, 162.6, 146.5, 117.8, 114.9, 100.4, 72.0, 68.4, 67.5, 61.1, 52.9, 51.0, 49.7, 48.9, 48.1, 42.7, 39.2, 39.1, 30.9, 29.2, 28.1, 28.1, 27.7, 24.8, 22.6, 22.2, 22.0, 15.9;

R-(COCHO)₆ 49

The cyclic peptide **48** was obtained following the general procedures (1) and (2). The compound **49** was obtained following the procedure to synthesize the compound **45** (12.1 mg, 8.5 μmol , 88%); analytical RP-HPLC: $R_t = 10$ min (C_{18} , 214 nm, 5-60% B in 30 min); MS (ESI positive mode); calcd for $C_{59}H_{89}N_{19}O_{22}$ $m/z = 1413.4$ $[M+H]^+$, found m/z 1414.8.

R- β Gal₆ 50a

The compound **50a** (5 mg, 2 μmol , 68%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: $R_t = 13$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): Calcd for $C_{98}H_{158}N_{22}O_{52}$ $m/z = 2476.0$ $[M+H]^+$, found: m/z 2478.3.

R- α Man₆ 50b

Compound **49b** (4.3 mg, 1.73 μmol , 62%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: $R_t = 13$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): Calcd for $C_{98}H_{158}N_{22}O_{52}$ m/z 2476.0 $[M+H]^+$, found: m/z 2477.0.

R- α Fuc₆ 50c

Compound **50c** (5.1 mg, 2.14 μmol , 75%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: $R_t = 14$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): Calcd for $C_{98}H_{158}N_{22}O_{46}$ m/z 2379.9 $[M+H]^+$, found: m/z 2381.2.

R- β Fuc₆ 50d

Compound **50d** (5 mg, 2.14 μmol , 72%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: $R_t = 14$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): $C_{98}H_{158}N_{22}O_{46}$ Calcd m/z 2379.9 $[M+H]^+$, found: m/z 2381.2.

R- β Lac₆ 50e

Compound **50e** (4.3 mg, 1.24 μmol , 67%) was obtained following general procedure (**4**) than to obtain **46a**; analytical RP-HPLC: $R_t = 13$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): Calcd m/z 3447.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 3448.12.

polyK(COCHO)₄NH₂ 55

The compound **55** (10 mg, 0.012 mmol, 70%) was obtained following the general procedure (**1**). analytical RP-HPLC: $R_t = 6.3$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): calcd average mass for $C_{35}H_{56}N_{10}O_{13}$ 824.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, found: m/z 413.2.

polyK(Ser)₄ONH₂ 56

The compound **56** was obtained following the general procedure (**1**) and the general procedure for Alloc removal (**3**). The compound x (164 mg, 1.5 eq.) was coupled on support in DMF at pH 8. After washing by DMF and DCM, the peptide was clived on the support by a solution of TFA/TIS/NH₂OH solution (95:2.5:2.5), concentrated, precipitated, triturated and washed with diethyl ether. The compound was afforded after HPLC purification and lyophilisation (156 mg, 0.153 mmol, 65%); analytical RP-HPLC: $R_t = 5.8$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): calcd average mass for $C_{41}H_{80}N_{15}O_{15}$ 1022.59 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 1022.07.

R-(BocSertBu)₄(Alloc)₁ 58

The linear decapeptide was assembled on Gly-SASRIN® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure (**1**). The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:99). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (0.59 mmol).

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide (0.59 mmol). Precipitation from Et₂O afforded cyclic peptide as a white solid powder (0.59 mmol). This crude material was used without further purification for the deprotection of Boc groups in acidic solution TFA/CH₂Cl₂ (1:1). The peptide was dissolved in

DMF (52 mL, $c = 10^{-2}$ mol/L) with the amino acid BocSer(tBu)OH (666 mg, 4.4 eq.) and the coupling reagent PyBOP (1320 mg, 4.4 eq.). The pH was adjusted by addition of DIPEA (435 μ L, 2.29 mmol). After 2h, the peptide **52** was precipitated with diethyl ether (700 mg, 0.513 mmol); analytical RP-HPLC: $R_t = 12.85$ min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min); MS (ESI positive mode): Calcd m/z 1362.0 $[M+H]^+$, found m/z 1363.1.

R-(COCHO)₄ NH₂ 59

The Alloc group was removed following the general procedure (**3**). The peptide **x** was dissolved without other purification in 100 mL of TFA/CH₂Cl₂ (1:1) solution. The reaction mixture was stirred during 1h at room temperature. The product was concentrated and precipitated from Et₂O afforded peptide **R-(Ser)₄ NH₂** (yield: quantitative). The intermediate (50 mg, 36.5 μ mol) and 40 equiv. of NaIO₄ (312 mg, 1.4 mmol) were dissolved in water at 10^{-2} M. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodecapeptide **54** as a white powder (38 mg, 0.030 mmol, 78%); analytical RP-HPLC: $R_t = 10$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MS (ESI positive mode): Calcd for m/z 1243.0 $[M+H]^+$, found $m/z = 1244.5$.

R-(R)₄ 62b

A solution of R-CHO₄Lys **59** (5.7 mg, 4.0 μ mol) and R-Ser₄ONH₂ **60** (48.2 mg, 24.0 μ mol) was stirred at 37°C in 0.1% TFA in H₂O (4 mL, v/v). After 4h, analytical HPLC shows the quantitative conversion into the RR-Ser₁₆ **61b**. (Analytical HPLC: R_t : 5.5 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); ESI⁺-MS: calcd. for C₂₉₉H₅₀₉N₉₅O₉₄ 6939.0, found: m/z 6940.5 $[M+H]^+$). After addition of acetone (100 μ L) to the crude reaction mixture, compound **61b** was oxidized with sodium periodate (205 mg, 0.96 mmol) at room temperature. The crude mixture was finally purified by semi-preparative HPLC after 1h to obtain the aldehyde-containing peptide RR-CHO₁₆ **62b** (25 mg, 3.85 μ mol, 92%). analytical RP-HPLC: R_t : 5.8 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); MS (ESI positive mode): calcd. for C₂₈₃H₄₂₉N₇₉O₉₄ 6442.0 $[M+H_2O]^+$, found: m/z 6460.3 ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.82-7.77 (m, 4H, 4 \times H_{ox}), 5.33-5.31 (m, 16H, 16 \times CH(OH)₂), 4.77-4.73 (m, 8H, 4 \times CH₂O), 4.50-4.33 (m, 30H, 30 \times H _{α}), 4.16 (d, 10H, ²J_{H α ,H α'} = 17.7Hz, 10 \times H _{α Gly}), 3.94-3.78 (m, 20H, 10 \times H _{α' Gly} and 10 \times H _{δ Pro}), 3.76-3.67 (m, 10H,

10×H_δPro) 3.36-3.18 (m, 48H, 24×CH_{2ε}Lys), 3.04 (t, 2H, ³J_{Hε,Hδ} = 7.7Hz, CH_{2ε}Lys), 2.30-2.41 (m, 10H, 10×H_βPro), 2.20-1.30 (m, 205H).

RR-βGal₁₆ **64a**

Compound **64a** (4.5 mg, 0.48 μmol, 82%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: R_t: 5.6 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₃₇₉H₆₀₅N₉₅O₁₇₄ 9276.508 [M+Na]⁺, found: *m/z* 9297.7. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.88-7.78 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.18-5.12 (m, 16H, 16×H1), 4.49-4.29 (m, 30H, 30×H_α), 4.15 (d, 10H, ²J_{H_α,H_{α'}} = 17.6Hz, 10×H_αGly), 4.05-4.02 (m, 16H, 16×H4), 3.93-3.65 (m, 110H, 16×H₂, 16×H₃, 16×H₅, 32×H₆, 10×H_{α'}Gly, 20×CH_{2δ}Pro), 3.28-3.11 (m, 48H, 24×CH_{2ε}Lys), 2.98 (t, 2H, ³J_{Hε,Hδ} = 8.0Hz, CH_{2ε}Lys), 2.41-2.30 (m, 10H, 10×H_βPro), 2.18-1.30 (m, 205H).

RR-αMan₁₆ **64b**

Compound **64b** (6.0 mg, 0.64 μmol, 88%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: R_t: 5.7 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₃₇₉H₆₀₅N₉₅O₁₇₄ 9276.508, found: *m/z* 9298.0 [M+Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.88-7.78 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.49 (s, 16H, 16×H1), 4.49-4.29 (m, 30H, 30×H_α), 4.09 (d, 10H, ²J_{H_α,H_{α'}} = 17.6Hz, 10×H_αGly), 4.11-4.02 (m, 16H, 16×H2), 3.85-3.53 (m, 110H, 16×H₃, 16×H₄, 16×H₅, 32×H₆, 10×H_{α'}Gly, 20×CH_{2δ}Pro), 3.38-3.23 (m, 48H, 24×CH_{2ε}Lys), 3.04 (t, 2H, ³J_{Hε,Hδ} = 8.0Hz, CH_{2ε}Lys), 2.41-2.30 (m, 10H, 10×H_βPro), 2.08-1.21 (m, 205H).

RR-βLac₁₆ **64c**

Compound **64c** (4.7 mg, 0.395 μmol, 68%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: R_t: 5.4 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₄₇₅H₇₆₅N₉₅O₂₅₄ 11870.7870, found: *m/z* 11892.5 [M+Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.89-7.77 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.27-5.21 (m, 16H, 16×H1'), 4.76-4.74 (m, 8H, 4×CH₂O), 4.52 (d, 16H, ³J_{1,2} = 7.7Hz, 16×H1), 4.50-4.30 (m, 30H, 30×H_α), 4.15

(d, 10H, $^2J_{\text{H}\alpha,\text{H}\alpha'} = 17.6\text{Hz}$, $10\times\text{H}_{\alpha\text{Gly}}$), 4.06-3.96 (m, 36H, $16\times\text{H}_4$, $10\times\text{H}_{\alpha'\text{Gly}}$, $10\times\text{H}_{\delta\text{Pro}}$), 3.94-3.75 (m, 138H, $16\times\text{H}_3$, $16\times\text{H}_4'$, $16\times\text{H}_5$, $16\times\text{H}_5'$, $32\times\text{H}_6$, $32\times\text{H}_6'$, $10\times\text{H}_{\delta'\text{Pro}}$), 3.72 (dd, 16H, $^3J_{3,4} = 3.4\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 9.9\text{Hz}$, $16\times\text{H}_3$), 3.67-3.58 (m, 32H, $16\times\text{H}_2$, $16\times\text{H}_2'$), 3.38-3.22 (m, 48H, $24\times\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), 3.04 (t, 2H, $^3J_{\text{H}\epsilon,\text{H}\delta} = 7.7\text{Hz}$, $\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), 2.42-2.30 (m, 10H, $10\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 2.20-1.30 (m, 205H).

RR- β Fuc₁₆ **64f**

Compound **64f** (6.0 mg, 0.665 μmol , 88%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: R_t : 5.7 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for $\text{C}_{379}\text{H}_{605}\text{N}_{95}\text{O}_{158}$ 9020.23 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 9021.6; ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.84-7.66 (m, 20H, $20\times\text{H}_{\text{ox}}$), 5.08-4.97 (m, 16H, $16\times\text{H}_1$), 4.43-4.20 (m, 40H, $40\times\text{H}_{\alpha}$), 4.11-3.98 (m, 16H, $16\times\text{H}_3$), 3.89-3.80 (m, 16H, $16\times\text{H}_5$), 3.77-3.56 (m, 62H, $16\times\text{H}_2$, $16\times\text{H}_4$, $10\times\text{H}_{\alpha'\text{Gly}}$, $20\times\text{CH}_{2\delta\text{Pro}}$), 3.38-3.10 (m, 48H, $24\times\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), 3.04 (t, 2H, $^3J_{\text{H}\epsilon,\text{H}\delta} = 8.0\text{Hz}$, $\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), 2.33-2.18 (m, 10H, $10\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 2.11-1.08 (m, 253H).

RR- α Fuc₁₆ **64e**

Compound **64e** (6.1 mg, 0.67 μmol , 89%) was obtained following a similar procedure; analytical RP-HPLC: R_t : 5.7 min (gradient: 5 to 100% B in 15 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for $\text{C}_{379}\text{H}_{605}\text{N}_{95}\text{O}_{158}$ 9020.23 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found: m/z 9022.2; ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.84-7.66 (m, 20H, $20\times\text{H}_{\text{ox}}$), 5.08-4.97 (m, 16H, $16\times\text{H}_1$), 4.43-4.20 (m, 40H, $40\times\text{H}_{\alpha}$), 4.06-3.56 (m, 110H, $16\times\text{H}_2$, $16\times\text{H}_3$, $16\times\text{H}_4$, $16\times\text{H}_5$, $10\times\text{H}_{\alpha'\text{Gly}}$, $20\times\text{CH}_{2\delta\text{Pro}}$), 3.38-3.10 (m, 48H, $24\times\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), 3.04 (t, 2H, $^3J_{\text{H}\epsilon,\text{H}\delta} = 8.0\text{Hz}$, $\text{CH}_{2\epsilon\text{Lys}}$), 2.33-2.18 (m, 10H, $10\times\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 2.11-1.08 (m, 253H);

cRAFT (4MAP) **62a**

The aldehyde-containing RK-CHO₁₆ **62a** was prepared successively after oxime conjugation between R-CHO₄Ala₂ **45** (5.0 mg, 4.0 μmol) and polyKSer₄ONH₂ **56** (38.1 mg, 24.0 μmol) (RK-Ser₁₆: Analytical HPLC: $R_t = 7.4$ min (5 to 40% B in 15 min, $\lambda = 214$ and 250 nm); $^+$ -MS (ESI positive mode): calcd for $\text{C}_{216}\text{H}_{386}\text{N}_{74}\text{O}_{74}$ 5203.9, found: m/z 5204.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$) then

oxidation with sodium periodate following the procedures described for **62b**. analytical RP-HPLC: $R_t = 8.2$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 15 min); MS (ESI positive mode): calcd for $C_{200}H_{306}N_{58}O_{74}$ 4707.0 $[M+H]^+$, found: m/z 4707.8; 1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.77-7.76 (m, 4H, $4 \times H_{ox}$), 5.34 (s, 8H, $8 \times CH(OH)_2$), 5.28 (s, 8H, $8 \times CH(OH)_2$), 4.75-4.68 (m, 8H, $4 \times CH_2O$), 4.40-4.20 (m, 28H, $28 \times H_\alpha$), 4.12 (d, 2H, $^2J_{H_\alpha, H\alpha'} = 17.5$ Hz, $2 \times H_{\alpha Gly}$), 3.88-3.63 (m, 6H, $2 \times H_{\alpha' Gly}$, $2 \times CH_{2\delta Pro}$), 3.30-3.18 (m, 40H, $20 \times CH_{2\epsilon Lys}$), 2.92-2.36 (m, 8H, $2 \times CH_{2\beta Pro}$, $2 \times CH_{2\gamma Pro}$), 1.75-1.27 (m, 138H).

RD- α Fuc₁₆ **63e**

Compound **63e** (5.3 mg, 0.72 mmol, 65%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: $R_t = 13$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for $C_{296}H_{482}N_{74}O_{138}$ 7285.5 $[M+H]^+$, found: m/z 7287.9; 1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.83-7.77 (m, 20H, $20 \times H_{ox}$), 5.15-5.12 (m, 16H, $16 \times H-1$), 4.76-4.71 (m, 8H, $4 \times CH_2O$), 4.45-4.23 (m, 28H, $28 \times H_\alpha$), 4.12 (d, 2H, $^2J_{H_\alpha, H\alpha'} = 17.8$ Hz, $2 \times H_{\alpha Gly}$), 4.03-3.99 (m, 16H, $16 \times H-4$), 3.89-3.70 (m, 86H, $16 \times H-2$, $16 \times H-3$, $16 \times H-5$, $32 \times H-6$, $2 \times H_{\alpha' Gly}$, $2 \times CH_{2\delta Pro}$), 3.35-3.20 (m, 40H, $20 \times CH_{2\epsilon Lys}$), 2.35-1.32 (m, 146H).

RD- β Gal₁₆ **63a**

Compound **63a** (7 mg, 0.93 μ mol, 77%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: $R_t = 8.0$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for $C_{296}H_{482}N_{74}O_{154}$ 7541.4894, found: m/z 7563.4 $[M+Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.88-7.77 (m, 20H, $20 \times H_{ox}$), 5.15-5.12 (m, 16H, $16 \times H_1$), 4.76-4.71 (m, 8H, $4 \times CH_2O$), 4.45-4.23 (m, 28H, $28 \times H_\alpha$), 4.12 (d, 2H, $^2J_{H_\alpha, H\alpha'} = 17.8$ Hz, $2 \times H_{\alpha Gly}$), 4.03-3.99 (m, 16H, $16 \times H_4$), 3.89-3.70 (m, 86H, $16 \times H-3$, $16 \times H-4$, $16 \times H-5$, $32 \times H-6$, $2 \times H_{\alpha' Gly}$, $2 \times CH_{2\delta Pro}$), 3.35-3.20 (m, 40H, $20 \times CH_{2\epsilon Lys}$), 2.35-1.32 (m, 146H).

RD- α Man₁₆ **63b**

Compound **63b** (6.1 mg) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: $R_t = 13.2$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode):

calcd for C₂₉₆H₄₈₂N₇₄O₁₅₄ 7541.4894, found: *m/z* 7541 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.88-7.77 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.53 (m, 16H, 16×H-1), 4.76-4.71 (m, 8H, 4×CH₂O), 4.45-4.23 (m, 30H, 30×H_α), 4.12 (br s, 16H, H-2), 3.85-3.67 (m, 86H, 16×H-3, 16×H-4, 32×H-6, 2×H_{α'}Gly, 2×CH_{2δ}Pro), 3.65-3.54 (m, 16H, 16×H-5), 3.35-3.20 (m, 40H, 20×CH_{2ε}Lys), 2.35-1.32 (m, 146H).

RD-βLac₁₆ 63c

Compound **63c** (10.0 mg, 0.98 μmol, 82%) was obtained following general procedure (4).
analytical RP-HPLC: R_t = 8.0 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₃₉₂H₆₄₂N₇₄O₂₃₄ 10135.7678, found: *m/z* 10156.9 [M+Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.91-7.79 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.27-5.22 (m, 16H, 16×H1'), 4.76-4.74 (m, 8H, 4×CH₂O), 4.52 (d, 16H, ³J_{1,2} = 7.7Hz, 16×H1), 4.47-4.26 (m, 28H, 28×H_α), 4.07-3.96 (m, 34H, 16×H6a', 16×H4, 2×H_αGly), 3.93-3.75 (m, 118H, 16×H3', 16×H4', 16×H5, 16×H5', 16×H6b', 32×H6', 2×H_{α'}Gly, 2×CH_{2δ}Pro), 3.73 (dd, 16H, ³J_{3,4} = 3.2Hz, ³J_{2,3} = 10.0Hz, 16×H3), 3.68-3.59 (m, 32H, 16×H2, 16×H2'), 3.37-3.24 (m, 40H, 20×CH_{2ε}Lys), 2.36-1.27 (m, 146H);

RD-αTF₁₆ 63d

Compound **63d** (6.0 mg, 0.55 μmol, 69%) was obtained following general procedure (4).
analytical RP-HPLC: R_t = 7.9 min (5 to 40% B in 15 min, λ = 214 and 250 nm); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₄₂₄H₆₉₀N₉₀O₂₃₄ 10792.6088, found: *m/z* 10836.5 [M+2Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.80-7.76 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.62-5.59 (m, 16H, 16×H1'), 4.73-4.69 (m, 8H, 4×CH₂O), 4.56 (td, 16H, ³J_{1',2'} = 3.8, ³J_{2',3'} = 11.5Hz, 16×H2'), 4.51 (d, 16H, ³J_{1,2} = 7.6Hz, 16×H1), 4.41-4.22 (m, 44H, 16×H4', 28×H_α), 4.15-4.07 (m, 18H, 16×H3', 2×H_αGly), 4.02 (bt, 16H, ³J_{5',6'} = 6.0Hz, 16×H5'), 3.93 (bd, 16H, ³J_{3,4} = 3.0Hz, 16×H4), 3.83-3.62 (m, 102H, 16×H3, 16×H5, 32×H6, 32×H6', 2×H_{α'}Gly, 2×CH_{2δ}Pro), 3.58-3.52 (m, 16H, 16×H2), 3.33-3.18 (m, 40H, 20×CH_{2ε}Lys), 2.36-1.27 (m, 194H).

RD-βFuc₁₆ 63f

Compound **63f** (5.8 mg, 0.795 μ mol, 70%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: $R_t = 15.9$ min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 30 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for $C_{296}H_{482}N_{74}O_{138}$ 7285.5, found: m/z 7287.1 $[M+H]^+$.

DD-COCHO₄ 66a

The compound **66a** (3.5 mg, 0.81 μ mol, 63%) was obtained following the general procedure for the synthesis of the compound **62a**. analytical RP-HPLC: $R_t = 9$ min (C_{18} , 214 nm, 5-60% B in 20 min); MS (ESI positive mode): calcd for $C_{183}H_{284}N_{54}O_{69}$ 4342.2, found: m/z 1086.8 $[M+4H]^{4+}$.

DD- β Gal₁₆ 67a

Compound **67a** (3.4 mg, 0.473 μ mol, 65%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: R_t : 9.5 min (gradient: 5 to 100% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for $C_{279}H_{460}N_{70}O_{149}$ 7179.1, found: m/z 7183.0 $[M+H]^+$; 1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.81 (s, 8H, $8\times H_{ox}$), 7.75 (s, 9H, $9\times H_{ox}$), 7.70 (s, 3H, $3\times H_{ox}$), 5.06 (m, 16H, $16\times H-1$), 4.39-4.14 (m, 33H, $20\times H_{\alpha Lys}$, $5\times H_{\alpha Ala}$, $4\times CH_2-O$), 3.94 (s, , 16H, $16\times H-4$), 3.83-3.65 (m, 80H, $16\times H-2$, $16\times H-3$, $16\times H-5$, $32\times H-6$), 3.29-3.09 (m, 38H, $19\times H_{\epsilon Lys}$), 2.98-2.92 (m, 2H, $2\times H_{\epsilon Lys}$), 1.87-1.21 (m, 135H, $20\times CH_{2\beta Lys}$, $20\times CH_{2\gamma Lys}$, $20\times CH_{2\delta Lys}$, $5\times CH_3Ala$);

DD- α Man₁₆ 67b

Compound **67b** (2.9 mg, 0.43 μ mol, 60%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: R_t : 9.5 min (gradient: 5 to 100% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for $C_{279}H_{460}N_{70}O_{149}$ 7179.1, found: m/z 7183.0 $[M+H]^+$; 1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.81 (s, 8H, $8\times H_{ox}$), 7.75 (s, 9H, $9\times H_{ox}$), 7.70 (s, 3H, $3\times H_{ox}$), 5.06 (m, 16H, $16\times H-1$), 4.39-4.14 (m, 33H, $20\times H_{\alpha Lys}$, $5\times H_{\alpha Ala}$, $4\times CH_2-O$), 3.94 (s, , 16H, $16\times H-4$),

3.83-3.65 (m, 80H, 16×H-2, 16×H-3, 16×H-5, 32×H-6), 3.29-3.09 (m, 38H, 19×H_{εLys}), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H_{εLys}), 1.87-1.21 (m, 135H, 20×CH_{2βLys}, 20×CH_{2γLys}, 20×CH_{2δLys}, 5×CH_{3Ala});

DD-αFuc₁₆ 67c

Compound **67c** (3.9 mg, 0.53 μmol, 73%) was obtained following general procedure (**4**); analytical RP-HPLC: R_t: 10 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₂₇₉H₄₆₀N₇₀O₁₃₃ 6922.14, found: *m/z* 6924.3 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.77 (s, 10H, 10×H_{ox}), 7.72 (s, 8H, 8×H_{ox}), 7.69 (s, 2H, 2×H_{ox}), 5.58-5.50 (m, 16H, 16H-1), 4.39-4.15 (m, 33H, 20×H_{αLys}, 5×H_{αAla}, 4×CH_{2-O}), 4.04 (m, 16H, 16×H-5), 3.98-3.76 (m, 48H, 16×H-2, 16×H-3, 16×H-4), 3.29-3.10 (m, 38H, 19×H_{εLys}), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H_{εLys}), 1.87-1.21 (m, 183H, 16×CH_{3Fuc}, 20×CH_{2βLys}, 20×CH_{2γLys}, 20×CH_{2δLys}, 5×CH_{3Ala});

DD-βFuc₁₆ 67d

Compound **67d** (1.8 mg, 0.26 μmol, 70%) was obtained following general procedure (**4**); analytical RP-HPLC: R_t: 10 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.82-7.66 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.03 (m, 16H, 16H-1), 4.39-4.14 (m, 33H, 20×H_{αLys}, 5×H_{αAla}, 4×CH_{2-O}), 3.91-3.82 (m, 16H, 16×H-5), 3.77-3.65 (m, 48H, 16×H-2, 16×H-3, 16×H-4), 3.29-3.12 (m, 38H, 19×H_{εLys}), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H_{εLys}), 1.87-1.21 (m, 183H, 16×CH_{3Fuc}, 20×CH_{2βLys}, 20×CH_{2γLys}, 20×CH_{2δLys}, 5×CH_{3Ala}); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₂₇₉H₄₆₀N₇₀O₁₃₃ 6922.14, found: *m/z* 6922.8 [M+H]⁺

DR-COCHO₁₆ 66b

The compound **66b** (26 mg, 3.98 μmol, 73%) was obtained following the general procedure for the synthesis of the compound **66a**; analytical RP-HPLC: R_t = 9.75 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 20 min); MS (ESI positive mode): calcd average mass for 6518.5, found: *m/z* 1304.7 [M+5H]⁵⁺.

DR- β Gal₁₆ 68a

Compound **68a** (5.4 mg, 0.6 μ mol, 73%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: R_t: 10 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd average mass for C₃₅₉H₅₇₆N₉₀O₁₆₉ 8855.9, found: m/z 8859 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.80-7.66 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.01-4.99 (m, 16H, 16H-1), 4.64-4.47 (m, 13H, 4×CH₂-O, 5×H _{α} Lys), 4.39-4.14 (m, 32H, 19×H _{α} Lys, 5×H _{α} Ala, 8×H _{α} Pro), 3.91-3.82 (d, 8H, 8×H _{α} Gly, ²J_{H α ,H α'} = 17.08Hz), 3.94 (m, 16H, 16×H-4), 3.85-3.54 (m, 96H, 16×H-3, 16×H-2, 16×H-5, 32×H-6, 16×H _{δ} Pro), 3.29-3.12 (m, 46H, 23×H _{ϵ} Lys), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H _{ϵ} Lys), 2.37-2.20 (m, 8H, 8×H _{β} Pro), 2.12-1.17 (m, 183H, 8×H _{β} Pro, 8×CH₂ γ Pro, 24×CH₂ β Lys, 24×CH₂ γ Lys, 24×CH₂ δ Lys, 5×CH₃Ala);

DR- α Man₁₆ 68b

Compound **68b** (6 mg, 0.67 μ mol, 82%) was obtained following general procedure (4); analytical RP-HPLC: R_t: 10 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₃₅₉H₅₇₆N₉₀O₁₆₉ 8855.9, found: m/z 8856 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.80-7.66 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.49 (s, 16H, 16H1), 4.64-4.47 (m, 13H, 4×CH₂-O, 5×H _{α} Lys), 4.39-4.14 (m, 32H, 19×H _{α} Lys, 5×H _{α} Ala, 8×H _{α} Pro), 3.91-3.82 (m, 20H, 16×H2, 4×H _{α} Gly), 3.85-3.54 (m, 100H, 4×H _{α} Gly, 16×H-3, 16×H-4, 16×H-5, 32×H-6, 16×H _{δ} Pro), 3.29-3.12 (m, 46H, 23×H _{ϵ} Lys), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H _{ϵ} Lys), 2.37-2.20 (m, 8H, 8×H _{β} Pro), 2.12-1.17 (m, 183H, 8×H _{β} Pro, 8×CH₂ γ Pro, 24×CH₂ β Lys, 24×CH₂ γ Lys, 24×CH₂ δ Lys, 5×CH₃Ala);

DR- α Fuc₁₆ 68c

Compound **68c** (5 mg, 0.58 μ mol, 66%) was obtained following general procedure (4). analytical RP-HPLC: R_t: 10.8 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₃₅₉H₅₇₆N₉₀O₁₆₉ 8600.1, found: m/z 8606.6 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.83-7.66 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.82-5.48 (m, 16H, 16H1), 4.64-4.47 (m, 13H, 4×CH₂-O, 5×H _{α} Lys), 4.41-4.18 (m, 32H, 19×H _{α} Lys, 5×H _{α} Ala, 8×H _{α} Pro), 4.12-3.01 (m, 24H, 8×H _{α} Gly, 16H-5), 3.85-3.54 (m, 64H, 16×H-2, 16×H-3, 16×H-4, 16×H _{δ} Pro), 3.34-3.10

(m, 46H, 23×H_{εLys}), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H_{εLys}), 2.32-2.20 (m, 8H, 8×H_{βPro}), 2.07-1.23 (m, 183H, 8×H_{βPro}, 8×CH_{2γPro}, 24×CH_{2βLys}, 24×CH_{2γLys}, 24×CH_{2δLys}, 5×CH_{3Ala}), 1.19-1.09 (m, 48H, 16×CH_{3Fuc}).

DR-βFuc₁₆ **68d**

Compound **68d** (5.6 mg, 0.65 μmol, 75%) was obtained following general procedure (**4**); analytical RP-HPLC: R_t: 10.8 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MALDI-TOF-MS (positive linear mode): calcd for C₃₅₉H₅₇₆N₉₀O₁₆₉ 8600.1, found: *m/z* 8599.6 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.83-7.66 (m, 20H, 20×H_{ox}), 5.82-5.48 (m, 16H, 16H-1), 4.64-4.47 (m, 13H, 4×CH₂-O, 5×H_{αLys}), 4.41-4.18 (m, 32H, 19×H_{αLys}, 5×H_{αAla}, 8×H_{αPro}), 4.12-3.01 (d, 8H, 8×H_{αGly}, ²J_{Hα,Hα'} = 17.08Hz), 3.92-3.54 (m, 80H, 16×H-2, 16×H-3, 16×H-4, 16H-5, 16×H_{δPro}), 3.34-3.10 (m, 46H, 23×H_{εLys}), 2.98-2.92 (m, 2H, 2×H_{εLys}), 2.32-2.20 (m, 8H, 8×H_{βPro}), 2.14-1.09 (m, 231H, 8×H_{βPro}, 8×CH_{2γPro}, 24×CH_{2βLys}, 24×CH_{2γLys}, 24×CH_{2δLys}, 5×CH_{3Ala}, 16×CH_{3Fuc}).

R-Dde₄(BocSer(tBu))₂ **72**

Cyclodecapeptide **72** was synthesized by following the procedure (**1**) and (**2**). Analytical RP-HPLC of the crude reaction mixture shows complete conversion of the corresponding linear decapeptide into **72**; analytical RP-HPLC: R_t = 12.9 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MS (ESI positive mode): calcd for C₁₁₄H₁₈₃N₁₈O₂₆ *m/z* 2220.4; found: *m/z* 2220.1 [M +H]⁺.

R-Eei₄(BocSer(tBu))₂

Compound was synthesized by following the procedure described for **77**. After Dde removal withHydrazine, the incorporation of an aminoxy linker was achieved using Eei-Aoa-OSu **52** (387 mg; 1.5 mmol) and DIPEA (165 μL; 1 mmol; pH 8) in DMF (25 mL) (340 mg; 0.16 mmol, 65%) from the corresponding linear peptide sequence (three steps); Analytical RP-HPLC R_t = 12.7 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MS (ESI positive mode): calcd for C₉₈H₁₇₁N₂₂O₃₀ *m/z* 2136.3; found: *m/z* 2136.1 [M +H]⁺.

R-(ONH₂)₄Ser₂ 73

Compound **73** was synthesized by following the procedure described for **78**; analytical RP-HPLC of the crude reaction mixture shows complete conversion of the protected sequence into 13; analytical RP-HPLC $R_t = 5.7$ min (5 to 60% B in 15 min, 214 nm); MS (ESI positive mode): calcd for C₆₄H₁₁₅N₂₂O₂₂ m/z 1543.8; found: m/z 1543.6 [M + H]⁺.

R-LELTE₄(α GalNAc)₂ 75a

Compound **75a** was obtained from R(4LELTE-2CHO) (14 mg; 0.0034 mmol) and GalNAc- α ONH₂ **25** (3 mg; 0.014 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v) following the procedure described previously (10 mg; 0.0022 mmol, 66%); analytical RP-HPLC: $R_t = 8.1$ min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-TOF-HRMS (positive linear mode): calcd for C₁₉₀H₃₀₄N₄₄O₈₀ m/z 4483.1, found: m/z 4483.19 [M+H]⁺.

R-LELTE₄Ox₂ 75b

Compound **75b** was prepared following the three-step procedure described for **75a**. The R(4ONH₂-2Ser) **73** (12 mg; 0.0068 mmol) was first treated with LELTE-CHO **70a** (28 mg; 0.041 mmol). The resulting R(4LELTE- 2Ser) (analytical RP-HPLC: $R_t = 8.3$ min, 5 to 100% B in 15 min, 214 nm; ESI-MS (positive mode): calcd for C₁₇₆H₂₈₇N₄₂O₇₀ 4109.0; found: m/z 4109.5 [M + H]⁺) was then oxidized with sodium periodate (29 mg; 0.14 mmol) in water (7 mL). The R(4LELTE-2CHO) **74** was purified by RP-HPLC (25 mg; 0.006 mmol, 91%) from x (two steps); analytical RP-HPLC: $R_t = 8.3$ min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm). This oxidized compound (11 mg; 0.0027 mmol) was reacted with Hydroxylamine Hydrochloride (0.8 mg; 0.011 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v) to obtain **75b** after purification (7.5 mg; 0.018 mmol, 68%). analytical RP-HPLC: $R_t = 8.4$ min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-TOF-HRMS (positive linear mode): calcd for C₁₇₄H₂₇₈N₄₂O₇₀ 4076.95 [M+H]⁺ found: m/z 4076.95

R-(BocSer(tBu))₄-Dde₂ 77

The linear decapeptide precursor of 77 (0.25 mmol) was cyclized while highly diluted in CH₂Cl₂ (500 mL) with PyBOP (156 mg; 0.3 mmol) and DIPEA (82 μ L; 0.5 mmol; pH 8). After stirring for 1h at room temperature, the solution was evaporated to dryness and peptide 77 recovered by precipitation in Et₂O. analytical RP-HPLC: R_t = 14.9 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MS (ESI positive mode): calcd for C₁₁₈H₂₀₁N₂₀O₃₀ *m/z* 2378.5; found: *m/z* 2378.1 [M +H]⁺.

R-(BocSer(tBu))₄-Eei₂

Protected cyclodecapeptide 77 (0.25 mmol) was treated for 1H at room temperature with a solution of 3%Hydrazine in DMF (50 mL). After evaporation and precipitation in Et₂O, Eei-Aoa-OSu 6 (129 mg; 0.5 mmol) and DIPEA (83 μ L; 0.5 mmol; pH 8) were added, and the solution was stirred in DMF (25 mL). The coupling reaction was monitored by analyticalHPLC and reached completion after 2H. The solvent was then evaporated using aHigh-vacuum pump and the excess of 6 removed by precipitation in Et₂O. Compound 7 was used without further purification. Yield: 52% (300 mg; 0.13 mmol) from the corresponding linear peptide sequence (three steps); analytical RP-HPLC: R_t = 14.1 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MS (ESI positive mode): calcd for C₁₁₀H₁₉₅N₂₂O₃₂ *m/z* 2336.4; found: *m/z* 2336.2 [M +H]⁺.

R-Ser₄(ONH₂)₂ 78

Crude compound (196 mg; 0.084 mmol) was treated with a cocktail of TFA/TIS/H₂O (50 mL; 95:2.5:2.5 v/v/v). After 2H of stirring at room temperature, the solution was evaporated, and fully deprotected cyclopeptide 78 was recovered by precipitation in Et₂O as a white TFA salt. analytical RP-HPLC: R_t = 5.7 min (5 to 60% B in 15 min, 214 nm); MS (ESI positive mode): calcd for C₆₆H₁₁₉N₂₂O₂₂ *m/z* 1571.9; found: *m/z* 1571.9 [M +H]⁺.

R-Ox₄LELTE₂ 80b

Peptide **73** (14 mg; 0.0069 mmol) was dissolved in a mixture of CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v), and LELTE-CHO **70a** (27 mg; 0.041 mmol) was added to the solution. The mixture was stirred at 37 °C overnight, and then acetone (1 mL) was added. The resulting LELTE conjugate R(4Ser-2LELTE) (analytical RP-HPLC: R_t = 12.6 min (5 to 40% B in 15 min, 214 nm); ESI-MS (positive mode): calcd for C₁₂₂H₂₀₅N₃₂O₄₆ 2854.5; found: *m/z* 2854.3 [M + H]⁺) was used without further treatment. Sodium periodate (59 mg; 0.28 mmol) was then added to the crude solution of R(4Ser-2LELTE) and the mixture purified by RP-HPLC (R_t = 13.1 min, (5 to 100% B in 30 min, 214 nm) after 1H to isolate the corresponding R(4CHO-2LELTE) (18 mg; 0.0066 mmol, 95%) from 8 (two steps); analytical RP-HPLC: R_t = 12.9 min (5 to 60% B in 15 min, 214 nm). This compound (9 mg; 0.0033 mmol) was finally stirred at 37 °C with hydroxylamine hydrochloride (1.8 mg; 0.026 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v). After RP-HPLC purification (R_t = 13.9 min, (5 to 100% B in 30 min, 214 nm), compound **77** was obtained (6.5 mg; 0.0023 mmol, 70%); analytical RP-HPLC: R_t = 7.6 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-TOF-HRMS: calcd for C₁₁₈H₁₈₈N₃₂O₄₆ *m/z* 2812.32 found: *m/z* 2812.31 [M+Na⁺].

R-(αGalNAc)₄LELTE₂ **80a**

Compound **80a** was obtained from R(4CHO-2LELTE) (9 mg; 0.0033 mmol) and GalNAc-αONH₂ **25** (8 mg; 0.033 mmol) in CH₃CN/H₂O/TFA (2 mL; 1:1:0.1 v/v/v) following the procedure described for **x** (9.5 mg; 0.0026 mmol, 80%). analytical RP-HPLC: R_t = 7.1 min (5 to 100% B in 15 min, 214 nm); MALDI-TOF-HRMS (positive linear mode): calcd for C₁₅₀H₂₄₀N₃₆O₆₆ *m/z* 3624.64 [M+Na]⁺ found: *m/z* 3624.64.

N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid **52**

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, whereafter ethyl *N*-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5H of stirring at 80 °C and cooling to room temperature, water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed with DCM (3 x 50 mL). The water phase was brought to pH 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted

with EtOAc (4 x50 mL)(NB: After each extraction the pH was adjusted to 2-3 with a 1 MHydrochloride solution), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄, and concentrated in vacuum, providing compound **3** as a colorless oil (5.69 g, 35.3 mmol, 73%). MS (ESI negative mode): Calcd for C₆H₁₁NO₄ $m/z = 161.2 \text{ g.mol}^{-1}$, found $m/z = 161.0 \text{ g.mol}^{-1}$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.48 (s, 2H), 4.00 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.01 (s, 3H), 1.27 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$).

To a stirred solution of compound **3** (5.69 g, 35.3 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol) in ethyl acetate/ dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5H. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (2 x75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum to oil **4** (8.69 g, 33.7 mmol, 95%) which was used without further purification. MS (ESI positive mode): calcd for C₁₀H₁₄N₃O₇ m/z 258,1, found m/z 258.3 [M+H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.78 (s, 2H), 4.01 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.84 (s, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$).

Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride **82**

Sulfuryl chloride (16.1 mL, 200 mol) was added drop-wise to an icecooled suspension of NaN₃ (13.0g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3h. at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (400 mL), washed with H₂O (2 × 400 mL) then saturated aqueous NaHCO₃ (2×400 mL), dried over MgSO₄ and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the drop-wise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added drop-wise to the filtrate with stirring, the mixture chilled in an ice-bath, filtered and the filter cake washed with EtOAc (3×100 mL) to give **82** as colorless needles (26.4 g, 0.125 mmol, 63%). MS (ESI positive mode): calcd for C₃H₄ClN₅O₂S m/z 173.1, found $m/z = 173.0$ [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 9.53 (dd, 1H, $J = 1.3, 1.6\text{Hz}$), 8.09 (dd, 1H, $J = 1.6, 2.2\text{Hz}$), 7.68 (dd, 1H, $J = 1.3, 2.2\text{Hz}$)

Fmoc-K(N₃)-OH 83

To a stirred mixture of Fmoc-lysine-HCl (11 g, 27.2 mmol) and ZnCl₂ (0.368 g, 0.27 mmol) in MeOH/Water (8:2, 80 mL) at room temperature was added triethylamine (11.33 mL, 81 mmol) followed by imidazole-1-sulfonyl azide **x** (6.85 g, 32.4 mmol). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of triethylamine. The reaction mixture was stirred overnight and the pH was acidified at 2 using HCl 3M. The mixture was extracted with ethyl acetate (4x75 mL), then the combined organic phase was washed with brine (50ml), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated in order to obtain the building block **83** as a yellowish oil which was used without further purification (10 g, 25.1 mmol, 91%), analytical RP-HPLC: R_t = 15.03 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): calcd for C₂₆H₂₈N₂O₅ *m/z* 394.44; found *m/z* 394.2 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.75 (d, 2H, *J* = 7.4Hz), 7.60 (d, 2H, *J* = 7.4Hz), 7.38 (t, 2H, *J* = 7.4Hz), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.4Hz), 5.3 (d, 1H), 4.2 (d, 2H), 4.12 (t, 1H, *J* = 6.9Hz), 3.8 (m, 1H), 3.2 (t, 2H), 1.9-1.1 (m, 6H).

cRAFT (4N₃) 85

The linear decapeptide was assembled on Gly-SASRIN® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure (1) by incorporation of the building block **83** following by the cyclisation with the conditions of general procedure (2) (31 mg, 0.029 mmol, 61%); analytical RP-HPLC: R_t = 8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min); MS (ESI positive mode): calcd for C₄₄H₇₀N₂₂O₁₀ *m/z* 1067.2; found: *m/z* 1067.5 [M +H]⁺.

R_{trz}-βGal₄ 86a

The compound **86a** (4.1 mg, 2.11 μmol, 75%) was obtained following general procedure (5). analytical RP-HPLC: R_t: 8.5 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); ESI-MS (positive mode): calcd average mass for C₈₀H₁₂₆N₂₂O₃₀ *m/z* 1940.8, found: *m/z* 1942.3 [M+H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.96 (s, 2H, 2×H_{trz}), 7.95 (s, 2H, 2×H_{trz}), 4.94-4.91 (m, 4H, 4×H-1), 4.8-4.58 (m, 10H, 2×H_{αLys}, 4×CH₂propargyl), 4.45-4.30 (m, 14H, 2×H_{αLys}, 4×CH_{2εLys}, 2×H_{αPro}, 2×H_{αAla}), 4.05 (d, 2H, ²J_{Hα,Hα'} = 17.4Hz, 2×H_{αGly}), 3.89 (m, 4H, 4×H-4), 3.75-3.45 (m, 26H, 4×H-2,

4×H-3, 4×H-5, 8×H-6, 2×H_{αGly}, 4×H_{δPro}), 2.3-2.23 (m, 2H, 2×H_{βPro}), 2.09-1.42 (m, 22H, 4×CH_{2βLys}, 4×CH_{2δLys}, 2×H_{βPro}, 2×CH_{2γPro}), 1.3-1.15 (m, 14H, 2×CH_{3Ala}, 8×H_{γLys});

R_{trz}-αMan₄ 86b

The compound **86b** (3.9 mg, 2.0 μmol, 72%) was obtained following the general procedure (5). analytical RP-HPLC: R_t = 8.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 20 min; MS (ESI positive mode): [M+H]⁺ calcd for C₈₀H₁₂₇N₂₂O₃₄ *m/z* 1941.0; found *m/z* 1940.9; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) : δ 7.95 (m, 4H, 4×H_{trz}), 4.90 (bs, 4H, 4×H-1), 4.78-4.62 (m, 10H, 2×H_{αLys}, 4×CH_{2link}), 4.45-4.19 (m, 14H, 2×H_{αLys}, 4×CH_{2εLys}, 2×H_{αAla}, 2×H_{αPro}), 4.03 (d, 2H, ²J_{Hα,Hα'} = 17.6Hz, 2×H_{α'Gly}), 3.94-3.45 (m, 30H, 4×H-2, 4×H-3, 4×H-4, 4×H-5, 8×H-6, 2×H_{αGly}, 4×H_{δPro}), 2.3-2.23 (m, 2H, 2×H_{βPro}), 2.09-1.42 (m, 22H, 4×CH_{2βLys}, 4×CH_{2δLys}, 2×H_{βPro}, 2×CH_{2γPro}), 1.3-1.15 (m, 14H, 6×H_{MeAla}, 8×H_{γK});

R_{trz}-αFuc₄ 86c

The compound (3.6 mg, 1.91 μmol, 75%) was obtained following the general procedure (5); analytical RP-HPLC: R_t: 9.5 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.95 (d, 4H, 4×H_{trz}), 4.95 (d, 4H, 4×H-1), 4.78-4.62 (m, 10H, 2×H_{αLys}, 4×CH_{2propargyl}), 4.45-4.19 (m, 14H, 2×H_{αLys}, 4×CH_{2εLys}, 2×H_{αAla}, 2×H_{αPro}), 4.06 (d, 2H, ²J_{Hα,Hα'} = 17.2Hz, 2×H_{α'Gly}), 3.89-3.85 (m, 4H, 4×H-5), 3.81-3.67 (m, 16H, 4×H-2, 4×H-3, 4×H-4, 2×H_{αGly}, 2×H_{δ1',δ2'Pro}), 3.61-3.52 (m, 2H, 2×H_{δ1,δ2Pro}), 2.31-2.21 (m, 2H, 2×H_{βPro}), 2.1-1.46 (m, 22H, 4×CH_{2βLys}, 4×CH_{2δLys}, 2×H_{βPro}, 2×CH_{2γPro}), 1.37-1.13 (m, 14H, 4×CH_{2γLys}, 2×CH_{3Ala}), 1.08-0.98 (m, 12H, 4×CH_{3Fuc}); MS (ESI positive mode): calcd average mass for C₈₀H₁₂₆N₂₂O₃₀ *m/z* 1877.0, found: *m/z* 1877.3 [M+H]⁺.

cRAFT (N₃)₂(COCHO)₂ 88

The linear peptide was obtained following the general procedure (1) and (2). The **R(N₃)₂(COCHO)₂ 88** was obtained following the same procedure to obtain the compound **45**

(5 mg, 4.4 μmol , 69%). analytical RP-HPLC: R_t : 12 min (gradient: 5 to 100% B in 20 min); MS (ESI positive mode): calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_{18}\text{O}_{14}$ m/z 1127.0, found: m/z 1128.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***c*RAFT (2 β Gal_{trz}) (2 α Fuc_{ox}) 90a**

The compound **90a** (0.6 mg, 0.318 μmol , 75%) was obtained following the general procedure (5). analytical RP-HPLC: R_t : 7.6 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MS (ESI positive mode): calcd average mass for $\text{C}_{78}\text{H}_{124}\text{N}_{20}\text{O}_{34}$ 1883.7, found: m/z 1884.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***c*RAFT (2 α Fuc_{trz}) (2 β Gal_{ox}) 90b**

The compound was obtained following firstly the general procedure (4) and then the general procedure (5) (1.2 mg, 0.63 μmol , 77%). analytical RP-HPLC: R_t : 7.6 min (gradient: 5 to 60% B in 20 min); MS (ESI positive mode): calcd for $\text{C}_{78}\text{H}_{124}\text{N}_{20}\text{O}_{34}$ m/z 1884.0, found: m/z 1885.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Biological Experiments

Enzyme-linked lectin assay (ELLA)

96-well microtiter plates (Nunc, MaxiSorp, Vienna, Austria) were coated with polymeric sugar (PAA sugar, 100 μL per well, diluted from a stock solution of 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 0.1 mM Ca^{2+} and 0.1 mM Mn^{2+} for 1H at 37 °C. The wells were then washed with PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (T-PBS, 3 \times 100 μL per well). The washing procedure was repeated after each incubation throughout the assay. The wells were then blocked with BSA in PBS (3% w/v, 100 μL per well) at 37°C for 1H. After washing, the wells were filled with 100 μL of serial dilutions of peroxidase-labelled lectin from 10^{-1} - 10^{-7} $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 0.01 M PBS (pH 7.4) containing 0.1 mM Ca^{2+} , 0.1 mM Mn^{2+} and BSA (0.3% w/v) and incubated at 37°C for 1h. The plates were washed with T-PBS (3 \times 100 μL per well) then the colour was developed using 100 μL per well of 0.05 M phosphate-citrate buffer containing *O*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, 0.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and ureaHydrogen peroxide (0.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The reaction was stopped after 10 min by adding H_2SO_4 (30% v/v, 50 μL per well) and the absorbance was measured at 490 nm in each well. Blank wells contained citrate-phosphate buffer. The concentration of lectin conjugate that read absorbance between 0.8 and 1 was used for inhibition experiments.

Hemagglutination Experiments

Hemagglutination experiments were completed with Rabbit red blood cells (BioMerieux). A solution of blood cells diluted in NaCl 150 mM (final concentration 2%) was placed into individual wells in a 96-well plate (VWR). Serially diluted concentrations of PA-IIL in Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7) containing CaCl_2 (3 μM) were added to each well and the cells were incubated at 37°C for 30 min followed by another 30 min interval at room temperature. The lowest concentration of lectin that still caused complete agglutination was then increased 4-fold for experiments used to determine the hemagglutination activity of fucose derivatives. These experiments were completed as described above except that 2-fold serial dilutions of inhibitors were added.

Inhibition experiments

The microtiter plates were coated with PAA-sugar as described previously. Each inhibitor was added in serial two-fold dilutions (60 μL per well) in PBS with lectine-HRP (60 μL) at the desired concentration on Nunclon (Delta) microtiter plates and incubated for 1H at 37°C. The above solutions (100 μL) were then transferred to the mannose-polymer-coated microplates, which were incubated for 1H at 37 °C. The plates were washed with T-PBS and the OPD substrate was added (100 μL per well). Colour development was stopped after 10 min and the absorbances were measured using a microtiter plate reader. The percentage inhibition was plotted against the logarithm of the concentration of the sugar derivatives. A sigmoidal curve was fitted and the concentration at 50% inhibition of binding of the ConA to polymeric mannose-coated microtiter plate wells was determined (IC_{50}). The percentages of inhibition were calculated as given in equation (1), where A =absorbance.

$$\% \text{ inhibition} = (A_{(\text{no inhibitor})} - A_{(\text{with inhibitor})}) / A_{(\text{no inhibitor})} \times 100 \quad (1)$$

The IC_{50} values obtained from several independently performed tests were in the range of $\pm 17\%$. Nevertheless, the relative inhibition values calculated from independent series of data were highly reproducible.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
2. G. J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *27*, 57-92.
3. T. L. Doering, W. J. Masterton, G. W. Hart, P. T. Englund, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 611-614.
4. A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
5. T. Feiz, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 701-710.
6. H. J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, D. Solis, *Trends in Biochemical Advances* **2011**, *36*, 298-313.
7. L. L. Kiessling, T. Young, T. D. Grubber, K. H. Mortell, *Glycoscience* **2008**, 2483-2523.
8. B. A. Williams, M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22907.
9. R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373-380.
10. H. Feinberg, D. A. Mitchell, K. Drickamer, W. I. Weis, *Science* **2001**, *294*, 2163.
11. C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488-7499.
12. a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; b) M. Mammen, S.K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
13. a) D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966-979. b) A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409-3424.
14. I. Gitsov, K. L. Wooley, C. J. Hawker, P. T. Ivanova, J. M. J. Frechet, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5621-5627.
15. H. Baigude, K. Katsuraya, K. Okuyama, K. Hatanaka, E. Ikeda, N. Shibata, T. Uryu, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 1400-1414.
16. G. Sanclimens, L. Crespo, E. Giralt, M. Royo, F. Albericio, *Biopolymers* **2004**, *76*, 283-297.
17. D. Lagnoux, T. Darbre, M. L. Schmitz, J. L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3941-3950.
18. J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.
19. R. Roy, M. G. Baek, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 291-309.
20. R. Roy, M. G. Baek, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1809-1816.
21. E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7-10.
22. a) K. H. Schlick, R. A. Udelhoven, G. C. Strohmeyer, M. J. Cloninger, *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 295-301. b) E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan; D. J. Singel, M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8820-8826.
23. a) M.G. Baek, R. Roy, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 11-17. b) R. Roy, M. G. Baek, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 240-249.
24. E. M. V. Johansson, E. Kolomiets, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J. L. Reymond, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1291-1299.
25. O. Ramström, S. Lohmann, T. Bunyapaiboonsri, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1711-1715.
26. a) A. Dondoni, *Chem. Asian. J.* **2007**, *2*, 700-708. b) L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266.
27. A. Dondoni, A. Marra, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6339-6345.
28. S. André, F. Sansone, H. Kaltner, A. Casnati, J. Kopitz, H. J. Gabius, R. Ungaro, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1649-1661.
29. S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrat-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2146-2159.

30. a) C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1982-1990. b) D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 655-672.
31. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076.
32. M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971
33. P. R. Ashton, V. Balzani, M. Clemente-Leon, B. Colonna, A. Credi, N. Jayaraman, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, M. Venturi, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 673-684.
34. M. Chwalek, R. Auzély, S. Fort, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1680-1688.
35. A. Nelson, J. M. Belitsky, S. Vidal, C. Steven Joiner, L. G. Baum, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11914-11922.
36. J. M. Belitsky, J. F. Stoddart, ACS Symposium Series, 960, Chap. 19, 356-374, **2001**.
37. a) M. Sollogoud, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1295-1303. b) S. Guieu, M. Sollogoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7060-7063
38. M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Carbohydrate Res.* **1998**, *310*, 35-41.
39. P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
40. G. L. Mulvey, P. Mercato, P. I. Kitov, J. Sadowska, D. R. Bundle, G. D. Armstrong, *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 640-649.
41. M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4019-4022.
42. a) M. Okada, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 67-104. b) B. Voit, D. Appelhans, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 727-735.
43. M.D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13343-13346.
44. a) B. Erdogan, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2002**, *35*, 7862-7864. b) J. J. Lavigne, D. L. Broughton, J. N. Wilson, B. Erdogan, U. H. F. Bunz, *Macromolecules* **2003**, *36*, 7409-7412.
45. J. E. Gestiwiki, C. W. Cairo, D. A. Mann, R. M. Owen, L. L. Kiessling, *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 149-155.
46. a) M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932. b) Z. Q. Yang, E. B. Puffer, J. K. Pontrello, L. L. Kiessling, *Carbohydrate Res.* **2002**, *337*, 1605-1613.
47. M. Dubber, J. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 239-246.
48. a) J. Katajisto, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7609-7615. b) J. Katajisto, P. Virta, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2004**, *15*, 890-896.
49. F. Morvan, A. Meyer, A. Jochum, C. Sabin, Y. Chevolot, A. Imberty, J. P. Praly, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, S. Vidal, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1637-1643.
50. M. Karskela, M. Helkearo, P. Virta, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 748-755.
51. K. Gorska, K. T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695-7700.
52. Y. Yamada, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1913-1922.
53. K. Matsuura; M. Hibino, T. Ikeda; Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 352-359.
54. A. L. Sorensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96-107.

55. P. Wang, X. Li, J. Chen, Y. Yuan, X. Wu, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1567-1602.
56. N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okanomoto, P. E. Dawson, Y. J. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501-510.
57. a) V. P. Torchilin, *Nat. Drug. Disc.* **2005**, *4*, 145-160. b) E. Soussan, S. Cassel, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 274-288.
58. A. Engel, S. K. Chatterjee, A. Al-Arifi, D. Riemman, J. Langner, P. Nuhn, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 51-57.
59. F.S. Hassane, A. Phalipon, M. Tanguy, C. Guerreiro, F. Bélot, B. Frisch, L.A. Mulard, F. Schuber, *Vaccine* **2009**, *27*, 5419-5426.
60. J. M. de la Fuente, S. Penadès, *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, *1760*, 636-651.
61. A. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernandez, S. Penadès, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909-1921.
62. J. M. de la Fuente, S. Penadés, *Tetrahedron*, **2005**, *16*, 387-391.
63. P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzales-Carreño, C. J. Serna, *J. Phys. (D, Appl. Phys.)* **2003**, *36*, R182-R197.
64. S. Penadés, M. Martin-Lomas, J. M. de la Fuente, T. W. Rademacher, *Magnetic Nanoparticles*, WO 2004/108165 A2.
65. X. Chen, G. S. Lee, A. Zettl, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6112-6116.
66. T. Ju, V. I. Otto, R.D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2-24.
67. a) M. Mutter, S. Vuillemier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 535-554. b) M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razamane, G. Tuchscherer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1482-1485.
68. P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter, *Biopolymers* **1996**, *39*, 565-574.
69. S. Peluso, T. Ruckle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432-437.
70. P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.
71. U. Sprengard, M. Schudok, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 321-324.
72. M. Ouberai, G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1293-1300.
73. P. Murat, D. Cressend, N. Spinelli, A. Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy, E. Defrancq, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2588-2591.
74. M. Galibert, Z. H. Jin, T. Fukurama, T. Saga, Y. Fujibayashi, P. Dumy, D. Boturyn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5422-5425.
75. G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2699-2702.
76. P. Murat, R. Bonnet, A. Van der Heyden, N. Spinelli, P. Labbé, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, P. Dumy, E. Defrancq, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6106-6114.
77. a) O. Renaudet, P. Dumy, *Open Glycoscience* **2008**, *1*, 1-7. b) O. Renaudet, P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3619-3622.
78. a) S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *5*, 1149-1159. b) O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737-741. c) O. Renaudet, G. Dasgupta, I. Bettahi, A. Shi, A. B. Nesburn, P. Dumy, L. BenMohamed, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11216.
79. I. Jeon, D. Lee, I. J. Krauss, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14337-14244.
80. T. K. Tiefenbrunn, P. E. Dawson, *Biopolymers* **2009**, *94*, 95-105.

81. C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030-10074.
82. L. L. Kiessling, R. A. Splain, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 619-653.
83. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-632.
- V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
84. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
85. A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687.
86. A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498-1500.
87. a) N. J. Agard, J. A. Preshler, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047. b) J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
88. X. Ning, J. Guo, A. Wolfert Margreet, G. J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2553-2555.
89. M. Ortega-Munoz, F. Perez-Balderas, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernandez-Mateo, J. Isac-Garcia, F. Santoyo-Gonzalez, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2454-2473.
90. M. Barra, O. Roy, M. Traïka, C. Taillefumier, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2941-2955.
91. A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4949-4977.
92. a) A. Dondoni, A. Marra, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546-7557.
93. W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.
94. K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
95. N. Spinelli, O. P. Edupuganti, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 219-222.
96. S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1230.
97. a) F. Peri, A. Deutman, B. L. La Ferla, F. Nicotra, *Chem. Commun.* **2002**, 1504-1505. b) M. R. Carrasco, R. T. Brown, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8853-8858. c) M. R. Carrasco, R. T. Brown, V. H. Doan, S. M. Kandel, F. C. Lee, *Biopolymers* **2006**, *84*, 414-420.
98. a) E. C. Rodriguez, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905-9906. b) E. C. Rodriguez, L. A. Marcaurrelle, C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7134-7135.
99. J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10360-10365.
100. a) A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *118*, 7743-7746. b) A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *46*, 7581-7584.
101. A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602-15603.
102. E. Grochowski, J. Jurczak, *Carbohydrate Res.* **1976**, *50*, C15-C16.
103. S. Cao, F. D. Tropper, R. Roy, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6679-6686.
104. a) E. C. Rodriguez, L. A. Marcaurrelle, C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7134-7135. b) E. C. Rodriguez, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905-9906.
105. O. Renaudet, *Thèse de doctorat*, **2002**, Université Joseph Fourier de Grenoble.
106. J. S. Brimacombe, *Methods in Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 376-378.
107. H. Kunz, W. Sager, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 283-287.
108. G. J. Posner, S. R. Haines, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5-8.
109. a) O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2628-2636; b) E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402-2410.
110. O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7575-7578.
111. R. U. Lemieux, *Meth. Carbohydrate Res.* **1963**, *2*, 23.
112. G. Escoffier, D. Gagnaire, J. O. Utile, *Carbohydrate Res.* **1975**, *39*, 375.
113. V. Duléry, O. Renaudet, C. Philouze, P. Dumy, *Carbohydrate Res.* **2007**, *342*, 894-900.

114. I. Bossu, B. Richichi, P. Dumy, O. Renaudet, *Synthesis of α - and β -L-fucopyranosylhydroxylamines*, **2011**, P. Kovac.
115. T. Ju, V. I. Otto, R. D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2-24.
116. J. Zhao, S. Wei, X. Ma, H. Shao, *Carbohydrate Res.* **2010**, *345*, 168-171.
117. R. U. Lemieux, R. M. Ratcliff, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
118. J. P. Richardson, D. Macmillan, *Glycoscience* **2008**, *Mucin-Based Vaccines*.
119. H. B. Mereyala, S. R. Gurrula, *Carbohydrate Res.* **1998**, *307*, 351-354.
120. K. K. Yeoh, T. D. Butters, B. L. Wilkinson, A. J. Fairbanks, *Carbohydrate Res.* **2009**, *344*, 586-591.
121. M. Horisberger, B. A. Lewis, F. Smith, *Carbohydrate Res.* **1972**, *23*, 144-147.
122. E. F. Megia, J. Correa, I. Rodriguez-Meizoso, R. Riguera, *Macromolecules* **2006**, *39*, 2113-2120.
123. a) R. J. Kaufman, R. S. Sidhu, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4941-4947. b) R. Roy, S. K. Das, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Z. Gan, *Synthesis* **2001**, *7*, 1049-1052.
124. G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613.
125. W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261-264.
126. K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138-146.
127. V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11952-11958.
128. S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
129. E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800.
130. Y. Mechref, M. V. Novotny, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 321-369.
131. J. P. McCoy, J. Varany, I. J. Goldstein, *Anal. Biochem.* **1983**, *130*, 437-444.
132. E. P. Mitchell, C. Sabin, L. Snajdrova, M. Porkona, S. Perret, C. Gautier, C. Hofr, N. Gilboa-Garber, J. Koca, M. Wimmerova, A. Imberty, *Proteins* **2005**, *56*, 735-746.
133. P. N. Kanellopoulos, K. Pavlou, A. Perrakis, B. Agianan, C. E. Vorgias, C. Mavrommatis, M. Soufi, P. A. Tucker, S. J. Hamdrakas, *J. Struct. Biol.* **1996**, *116*, 345-355.
134. R. Roy, D. Pagé, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1765-1770.
135. T. Hasegawa, T. Yonemura, K. Matsuura, K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 728-737.
136. M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932.
137. E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8820-8826.
138. C. C. Lin, Y. C. Yeh, C. Y. Yang, G. F. Chen, Y. C. Chen, Y. C. Wu, C. C. Chen, *Chem. Commun.* **2003**, 2920-2921.
139. I. Bossu, M. Šulc, K. Křenek, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, P. Dumy, V. Křen, O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1948-1959.
140. G. F. Audette, M. Vandonselaar, L. T. J. Delbaere, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 423-433.
141. E. Kolomiets, E. Johansson, O. Renaudet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1465-1468.
142. I. Bossu, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, *J. Carbohydrate Chem.* **2011**, *30*, 358-368.
143. R. Y. Yang, G. A. Rabinovich, F. T. Liu *Expert Rev Mol Med.* **2008**, *13*, 17-39.
144. M. E. Huflejt, H. Leffler, *J. Glycoconj.* **2004**, *20*, 247-55.
145. S. André, O. Renaudet, I. Bossu, P. Dumy, H.-J. Gabius, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 427-437.
146. D. Tielker, S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau, K. E. Jaeger, *Microbiology* **2005**, *151*, 1313-1323.
147. N. Garber, U. Guempel, N. Gilboa-Garber, R. J. Doyle, *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *48*, 331-334.

148. E. Mitchell, C. Houles, D. Sudakevitz, M. Wimmerova, C. Gautier, S. Pérez, A. M. Wu, N. Gilboa-Garber, A. Imberty, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 918-921.
 149. S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerova, J. P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2146-2159.
 150. I. Deguise, D. Lagnoux, R. Roy, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1321-1331.
 151. K. Marotte, C. Préville, C. Sabin, M. Moumé-Pymbock, A. Imberty, R. Roy, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2953-2961.
 152. E. M. V. Johansson, S. A. Cruz, E. Kolomiets, L. Buts, R. U. Kadam, M. Cacciarini, K. M. Bartels, S. P. Diggle, M. Camara, P. Williams, R. Loris, C. Nativi, F. Rosenau, K. E. Jaeger, T. Darbre, J. L. Reymond, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1249-1257.
 153. E. Vivier, E. tomassello, M. Baratin, T. Walter, S. Ugolini, *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 503-510.
 154. J. P. Santo, *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 473-475.
 155. R. Giorda, W. A. Rupert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt, M. Trucco, *Science* **1990**, *249*, 1298-1300.
 156. J. C. Ryan, E. C. Niemi, R. D. Goldfien, J. C. Hiserodt, W. S. Seaman, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 3244-3250.
 157. K. Bezouška, J. Pavlíček, B. Sopko, V. Křen, A. Fišerova, M. Pospíšil, P. Novak, V. Havlíček, *Scand. J. Immunol.* **2001**, *54*, 26.
 158. K. Bezouška, D. Kavan, H. Mrazek, D. Manglova, P. Bašova, V. Křen, *FEBS J.* **2008**, *275*, 81.
 159. K. Bezouška, R. Snajdrova, K. Krenek, M. Vancurova, A. Kadek, D. Adamek, P. Lhotak, D. Kavan, K. Hofbauerova, P. Man, P. Bojarova, V. Křen, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1434-1440.
 160. A. Drozdová, P. Bojarová, K. Křenek, L. Weignerová, B. Henßen, L. Elling, H. Christensen, H. H. Jensen, H. Pelantová, M. Kuzma, K. Bezouška, M. Krupová, D. Adámek, K. Slámová, V. Křen, *Carbohydrate Res.* **2011**, *346*, 1599-1609.
 161. O. Renaudet, K. Křenek, I. Bossu, P. Dumy, A. Kadek, D. Adamek, O. Vanek, D. Kavan, R. Gazak, M. Sulc, K. Bezouška, V. Křen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6800-6808.
-