



HAL
open science

Synthèse et étude de bêta-peptides glycoconjugués. Application en immunothérapie antitumorale

Marielle Barra

► **To cite this version:**

Marielle Barra. Synthèse et étude de bêta-peptides glycoconjugués. Application en immunothérapie antitumorale. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF21998 . tel-00724524

HAL Id: tel-00724524

<https://theses.hal.science/tel-00724524v1>

Submitted on 21 Aug 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.

N° d'ordre : DU : 1998

UNIVERSITE BLAISE PASCAL – CLERMONT-FERRAND II

(U.F.R. Sciences et Technologies)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° 630

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Chimie Organique et Biologique)

PAR

Marielle BARRA

**SYNTHESE ET ETUDE DE β -PEPTIDES GLYCOCONJUGUES
APPLICATION EN IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE**

Soutenue le 11 décembre 2009 devant la Commission d'Examen :

Rapporteurs : Brigitte JAMART-GREGOIRE (Pr., INPL, Nancy)
Agnès DELMAS (DR-CNRS, CBM, Orléans)

Examineurs : Hans Peter WESSEL (Dr., F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bâle)
Thierry GEFFLAUT (Pr., SEESIB, Université Blaise Pascal,
Clermont-Ferrand II)
Claude TAILLEFUMIER (Pr., SEESIB, Université Blaise Pascal,
Clermont-Ferrand II)
Olivier ROY (MCF, SEESIB, Université Blaise Pascal, Clermont-
Ferrand II)

Laboratoire Synthèse Et Etudes de Systèmes d'Intérêt Biologique – UMR CNRS 6504
24, avenue des Landais – 63177 AUBIERE

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Anne-Marie Delort, Directrice de Recherche et Directrice du SEESIB, Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire pour y effectuer ma thèse.

Je remercie également mon directeur de thèse, Claude Taillefumier, Professeur à l'Université Blaise Pascal – Clermont Ferrand II, pour m'avoir encadrée tout au long de ma thèse et pour m'avoir accordé de son temps aussi souvent que possible. Un grand merci pour sa disponibilité, son écoute et ses conseils.

Je remercie Olivier Roy, Maître de Conférence à l'Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II, pour m'avoir co-encadrée pendant ces trois années et pour m'avoir dispensé des conseils précieux.

Je tiens à remercier Agnès Delmas, Directrice de Recherche au Centre de Biophysique Moléculaire – Orléans, et Brigitte Jamart-Grégoire, Professeur à l'Institut National Polytechnique de Lorraine – Nancy, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Hans Peter Wessel, Docteur, F. Hoffmann-La Roche Ltd – Bâle (Suisse) et Thierry Gefflaut, Professeur à l'Université Blaise Pascal – Clermont Ferrand II d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Il convient de remercier les personnes avec qui nous avons collaboré pour leur aide précieuse. Dans un premier temps, je voudrais remercier Claude Leclerc, Responsable de l'Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie à l'Institut Pasteur – Paris, pour avoir accepté de prendre part au volet « Immunothérapie anticancéreuse » de ma thèse. Je remercie également Richard Lo-Man, Chargé de recherche et Edith Dériaud, Ingénieur, pour avoir grandement participé à l'évaluation biologique de nos structures.

Concernant la partie du projet « Analyse conformationnelle », je remercie Alison Edwards, Docteur à la Medway School of Pharmacy – Universités de Greenwich et du Kent (Royaume-Uni) pour avoir accepté de réaliser les expériences de dichroïsme circulaire sur nos oligomères. Merci pour toute l'aide et les conseils dont elle a bien voulu nous faire part. Je tiens tout particulièrement à remercier Emiliana de Santis, Doctorante sous la direction du Dr Alison Edwards, pour avoir effectué toutes les expériences de dichroïsme.

Je tiens par ailleurs à remercier Rein Ulijn, Professeur à l'Université de Strathclyde – Glasgow (Ecosse) pour avoir accepté de collaborer avec nous concernant l'étude des propriétés de gélification de certains de nos composés. Je remercie tout particulièrement

Apurba Das, Docteur et membre de l'équipe du Pr Ulijn avec qui j'étais plus particulièrement en contact et qui m'a dispensé de précieuses informations.

Au sein du laboratoire, je voudrais plus particulièrement remercier le Docteur Mounir Traïka, qui nous a grandement aidés sur la partie « Analyse conformationnelle » pour l'ensemble des expériences RMN. Rien n'aurait été possible sans lui.

Je tiens à adresser un immense merci au Docteur Marie-Laure Teyssot qui, malgré nos fréquents problèmes de communication (blonde + brune... !), m'a aidée plus qu'elle ne pourrait l'imaginer. Merci pour sa disponibilité, son écoute, sa patience (!) tout au long de ma thèse.

Merci également à Roland Remuson, Chargé de Recherche au sein de l'équipe, pour avoir participé au projet pour la synthèse de l'immunoadjuvant et pour avoir bien voulu relire mon manuscrit.

Je remercie également Lionel Nauton, Ingénieur d'Etude, pour sa participation au niveau de la modélisation moléculaire.

Et je voudrais remercier Aurélie Job, Technicienne, pour m'avoir apporté son aide pour les analyses par HPLC et pour sa gentillesse.

J'en viens à remercier toute la fine équipe de doctorants et post-doctorants dont j'ai fait partie pendant ces trois années : Carlos (Playmo), Greg (Caillou) et Sidonie (mes deux compagnons de galère), Antho, Johan, Flora, Michaël, Eléonore, José et Fadoua. Je tiens à adresser plus particulièrement des remerciements à Thomas (the Danish people) pour toute l'aide qu'il a pu me dispenser pendant ma thèse. Un grand merci à Stéphane pour m'avoir tenu éveillée les derniers soirs de rédaction et pour les fils rouges... Je remercie également Aurélien (Le Bleu) pour nous avoir fait découvrir tant de talents musicaux et pour son soutien moral! Et je finirais par Cécile (alias Chantal, Cantal, Germaine...et j'en passe) pour son immense bonne humeur et pour son soutien qui m'a été si précieux pendant les derniers mois. Merci pour les soirées scoubidous-gaufres et pour nos petits repas-ciné entre filles que j'appréciais particulièrement !

Je remercie enfin ma famille, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, et qui m'a soutenue et encouragée pendant ces trois années.

Enfin, je remercie David qui m'a encouragée et « supportée » tout au long de ma thèse... ce n'est que le début !

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	13
A- Partie Bibliographique	17
I- Immunothérapie anticancéreuse	19
1- Rappels bibliographiques	19
a- Système immunitaire	19
i- Cellules du système immunitaire et types de réponses immunitaires	19
ii- Immunoglobulines – Anticorps monoclonaux	22
iii- Reconnaissance de l'antigène – Notion d'épitope	24
b- Le cancer – Origines	24
2- Glycosylation et cancer	25
a- Glycoprotéines de type mucines	26
b- Antigènes saccharidiques associés aux tumeurs	28
3- Vaccination anticancéreuse	30
a- Immunothérapie du cancer	30
b- Candidats vaccins à base d'antigènes saccharidiques	32
II- Les β-peptides	38
1- Généralités	38
a- Les β-aminoacides	38
i- Les différents types d'aminoacides	38
ii- Exemples de β-aminoacides	39
iii- Intérêt des β-peptides	41
2- Synthèse des β-aminoacides	42
a- Biosynthèse	42
b- Obtention des β-aminoacides par voie chimique	43
3- Propriétés de structuration des β-peptides	44
a- Notion de structuration secondaire	44
b- Propriétés de structuration des β-peptides	45
i- Les hélices	47
ii- Les feuillettes et les coudes	54
B- Objectifs.....	57
I- Immunothérapie anticancéreuse	59
1- Structure des vaccins	62
a- Plateforme présentatrice multivalente de type β-peptidique	62
b- Introduction des résidus GalNAc par ligation chimique	64

c-	Structure des différents édifices synthétisés	64
2-	Stratégie de synthèse	66
II-	Analyse conformationnelle	66
C-	Résultats & Discussion : Synthèse	69
I-	Synthèse des oligomères β -peptidiques	71
1-	Essai de synthèse itérative de β -peptides sans agents de couplage	71
a-	Rappels bibliographiques	71
i-	Synthèse des précurseurs	73
ii-	Synthèse des aldéhydes et réactions de cycloaddition [3+2]	74
iii-	Conclusion de l'étude	78
2-	Synthèse des oligomères par couplage peptidique classique	78
a-	Plateformes de type « propargyl »	78
i-	Introduction du motif alcyne par une fonction amide	79
ii-	Introduction du motif alcyne sous forme d'éther	90
b-	Plateformes de type « azoture »	93
i-	Accès au monomère	93
ii-	Accès aux oligomères	93
c-	Plateformes de type « oxime »	96
i-	Voie « Phtalimide »	96
ii-	Voie « Alloc »	98
d-	Conclusion	105
II-	Synthèse des unités saccharidiques	106
1-	Séries « propargylamide » et « peptoïde »	108
2-	Série « azoture »	109
III-	Synthèse des édifices glycoconjugués	110
1-	Etude bibliographique : β -peptides glycosylés	110
2-	Ligation de type 1,2,3-triazole	113
a-	Rappels bibliographiques : Cycloaddition 1,3-dipolaire – Conditions expérimentales	113
b-	Série « propargylamide »	116
c-	Série « peptoïde »	125
d-	Série « azoture »	127
3-	Ligation de type oxime	129
IV-	Synthèse des structures pour les tests biologiques	130
1-	Tests de reconnaissance antigène-anticorps	130
a-	Schéma général des structures	131
b-	Synthèse des composés pour les tests ELISA	132

i-	Synthèse du motif biotine-espaceur	132
ii-	Synthèse des structures finales	132
2-	Evaluation de la réponse immunitaire et tests de ciblage	138
D-	Résultats & Discussion : Tests biologiques	143
1-	Tests de reconnaissance antigène-anticorps – Principe de L'ELISA	145
2-	Résultats	148
E-	Résultats & Discussion : Analyse conformationnelle	151
I-	Rappels bibliographiques : Techniques d'analyse conformationnelle	153
1-	Résonance Magnétique Nucléaire RMN	153
a-	RMN à une dimension (RMN 1D)	154
i-	Etude qualitative	154
ii-	Etude en température	155
iii-	Echange hydrogène-deutérium	156
iv-	Titration au DMSO-d ₆	156
b-	RMN à deux dimensions (RMN 2D)	156
2-	Dichroïsme Circulaire (DC)	159
3-	Infrarouge	162
a-	Amide I	163
b-	Amide A	164
4-	Diffraction des rayons X	165
5-	Modélisation moléculaire	166
II-	Analyse conformationnelle – Série « azoture »	168
1-	Etude des oligomères	168
a-	RMN	168
i-	Etude des spectres RMN 1D	169
ii-	Etude des corrélations dipolaires (effets nOe)	175
b-	Infrarouge	178
c-	Dichroïsme Circulaire	180
2-	Edifices glycoconjugués	185
a-	RMN	185
b-	Infrarouge	189
c-	Dichroïsme circulaire	190
III-	Analyse conformationnelle - Série « propargylamide »	192
a-	RMN	192
i-	RMN 1D	193
ii-	Etude des corrélations dipolaires (effets nOe)	197

F- Résultats & Discussion : Projet GELS	201
I- Introduction	203
1- Origine du projet	203
2- Etude bibliographique	203
3- Objectifs	207
II- Etudes des propriétés de gélification	208
1- Etude des composés non glycoconjugués	208
a- Organogel	208
b- Hydrogel	211
i- Déclenchement par variation du pH	211
ii- Déclenchement enzymatique	213
2- Etude des composés glycoconjugués	214
a- Organogel	215
b- Hydrogel	217
 CONCLUSION	 219
 PARTIE EXPERIMENTALE	 225
 Liste des composés synthétisés.....	 377
 BIBLIOGRAPHIE	 393

ABBREVIATIONS

Ac : Anticorps
Ag : Antigène
APC : Antigen-Presenting Cell
APTS : acide paratoluène sulfonique
Boc : *ter*-butyloxycarbonyl
C.T. : coefficient de température
CAN : ceric ammonium nitrate
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CD : cellule dendritique
CEA : carcinoma embryonic antigen
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COSY : COrrélation SpectroscopY
CRL : C-type lectin receptor
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CuAAC : Copper-Catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition
DC : Dichroïsme Circulaire
DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin
DEAD : Diethyl azodicarboxylate
DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate
DIBAL-H : hydrure de diisobutyle aluminium
DIPEA : *N,N*-Diisopropylethylamine
DMAC : *N,N'*-diméthylacetamide
DMAP : 4-(diméthylamino)pyridine
DMF : *N,N'*-diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
EDCi : *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT : Enzyme-linked immunosorbent spot
FDPP : pentafluorophenyl diphenylphosphinate
FT-IR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GalNAc : N-acétylgalactosamine
HATU : *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMPT : hexamethylphosphorous triamide
HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
HR-MS : High-Resolution-Mass Spectroscopy
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
IL : Interleukine
IR : Infra-Rouge
KLH : Keyhole-Limpet Hemocyanin
LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MAG : multi-antigénique
MET : Microscopie Electronique à Transmission

MGL : macrophage galactose-type C-type lectin
MR : Mannose Receptor
MRE : Main Residue Ellipticity
MUC : Mucine
NHS : *N*-hydroxysuccinimide
NMM : *N*-méthylmorpholine
nOe : nuclear Overhauser effect
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OVA : épitope T issu de l'ovalbumine
PAM : lipopeptide Pam₃-Cys
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PV : Polio-Virus
RAFT : Regioselectively Addressable Functionalized Template
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY : Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
SPPS : Solid Phase Peptide Synthesis
TACA : Tumor-Associated Carbohydrate Antigen
TBAF : fluorure de tétrabutylammonium
TBTA : Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TBTU : *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate
TCR : T-Cell Receptor
TFA : acide trifluoroacétique
TFE : 2,2,2-Trifluoroethanol
THF : tétrahydrofurane
TLR : Toll-Like receptor
TMSE : triméthylsilyléthyl-
TOCSY : TOtal Correlation Spectroscopy
TR : Tandem Repeat
trans-ACHC : acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique
trans-ACP : acide *trans*-3-amino-pyrrolidine-4-carboxylique
trans-ACPC : acide *trans*-2-aminocyclopentylcarboxylique

INTRODUCTION

Mes travaux de thèse ont débuté en octobre 2006 au moment de la création de la thématique « Bioconjugués, Peptidomimétiques » animée par le Professeur C. Taillefumier. Il s'agit de l'une des trois thématiques de l'équipe SYMPA (SYnthèse de Molécules à Potentialité Antitumorales) du Laboratoire SEESIB.

Les recherches développées au sein de cette thématique visent à développer de nouvelles chaînes pseudopeptidiques, pouvant avoir un intérêt, soit comme peptidomimétiques (chaînes latérales d'acides aminés protéinogéniques, propriétés de folding), soit comme plateformes multivalentes pour la présentation notamment d'unités saccharidiques.

C'est dans ce deuxième volet que s'inscrivent mes travaux de thèse. Ces derniers ont porté sur la synthèse d'homo β -peptides pouvant être facilement glycoconjugués par des méthodes de ligation chimique. Les β -peptides sont sans conteste les foldamères qui ont été les plus étudiés à ce jour, depuis les premiers travaux de Dieter Seebach et Samuel H. Gellman dans le milieu des années 90. Si la littérature sur les β -peptide est très importante, un vaste champ d'investigation concerne encore la synthèse et l'étude de ce type de chaînes, en association avec des unités saccharidiques.

Deux objectifs principaux m'ont été donnés au départ de cette thèse :

- d'une part construire des édifices β -peptidiques glycoconjugués pour une application en immunothérapie antitumorale,
- d'autre part l'étude conformationnelle des chaînes peptidiques préparées.

L'identification d'antigènes saccharidiques à la surface des cellules, associés à des tumeurs, a ouvert la voie de la recherche de vaccins thérapeutiques contre les cancers. En effet la glycosylation des protéines membranaires est souvent déficiente et incomplète dans les cellules cancéreuses, ce qui aboutit à l'élaboration de glycoprotéines inachevées ou modifiées exposant à l'extérieur de la membrane cellulaire des sucres en temps normal masqués. Ces sucres de surface constituent ainsi des marqueurs de cellules cancéreuses et leur niveau d'expression peut être corrélé à l'évolution de la maladie. La connaissance de structures glucidiques antigéniques a permis d'envisager des approches d'immunothérapie antitumorale. Cependant l'élaboration de vaccins anticancéreux se heurte à un certain nombre de difficultés, notamment la faible immunogénicité des sucres de surface. Ceci implique la nécessité de présenter plusieurs copies d'antigènes « sucres ». Pour ces travaux nous allons utiliser le plus simple d'entre eux, l'antigène Tn (GalNAc- α -O-ser/thr). Des assemblages β -peptides/Tn seront synthétisés de même que des assemblages β -peptide/Tn. Une évaluation de

l'antigénicité des édifices en fonction de la nature de la chaîne pourra ainsi être réalisée. Ces assemblages représentent la première pierre d'édifices plus élaborés dont le potentiel immunogène anticancer sera évalué à plus ou moins long terme. Notre choix s'est porté sur les β -peptides du fait de leur grande stabilité vis-à-vis des processus de dégradation métaboliques et protéolytiques.

Par ailleurs, nous nous intéresserons aux propriétés de structuration des oligomères β -peptidiques synthétisés. En effet, au-delà de leurs propriétés biologiques, les β -peptides présentent une forte tendance à adopter des structurations secondaires.

La première partie de ce manuscrit présentera une étude bibliographique couvrant les deux thèmes qui seront abordés par la suite. Dans un premier temps, après quelques rappels d'immunologie, nous développerons les relations entre glycosylation et cancer, aboutissant à la présentation d'antigènes. Nous évoquerons ensuite quelques exemples de vaccins anticancéreux à l'étude à ce jour. Puis, nous aborderons la partie du projet concernant les β -peptides et leurs propriétés de structuration.

Nous présenterons ensuite la synthèse des différentes plateformes β -peptidiques et des composés glycoconjugués qui en découleront. Ces derniers seront ensuite intégrés dans des structures dont l'antigénicité sera évaluée par des tests de reconnaissance antigène/anticorps.

Enfin, nous aborderons l'étude conformationnelle menée sur les oligomères et les résultats obtenus seront discutés.

A côté du projet développé dans le cadre de cette thèse, nous présenterons des études, menées en parallèle, portant sur des propriétés surprenantes de certains composés qui ont montré une forte tendance à former des gels dans des solvants organiques ou en milieu aqueux.

Nous dresserons finalement un bilan de ces trois années de recherche et nous évoquerons les perspectives qui seront développées dans la suite du projet.

A- Partie

Bibliographique

I- Immunothérapie anticancéreuse

1- Rappels bibliographiques

a- Système immunitaire

Le système immunitaire est un système de défense remarquablement adaptatif qui a évolué chez les vertébrés afin de leur apporter une protection vis-à-vis des micro-organismes pathogènes. Il met en jeu un grand nombre de cellules et de molécules différentes assurant d'une part une reconnaissance et d'autre part une réponse efficace et spécifique.

i- Cellules du système immunitaire et types de réponses immunitaires

L'efficacité de la réponse immunitaire repose sur deux groupes de cellules essentielles : les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène (APC).

➤ *Les lymphocytes* expriment à la surface de leur membrane des récepteurs qui fixent l'antigène ; ce sont les médiateurs des différents aspects de la réponse immunitaire : spécificité, diversité, mémoire et reconnaissance du Soi et du non-Soi. Il existe deux types de lymphocytes : les lymphocytes B et les lymphocytes T (Figure 1) et deux types de réponse immunitaire en découlent.

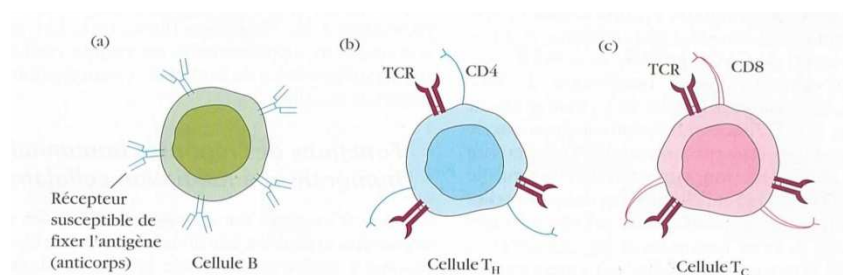


Figure 1 – Les deux types de lymphocytes¹

- *Lymphocytes B* : ils sont mis en jeu lors d'une *réponse immunitaire de type humorale*. Ils expriment à leur surface un récepteur de liaison à l'antigène spécifique qu'on nomme molécule d'anticorps membranaire. Ces récepteurs ne peuvent reconnaître qu'un seul antigène.

- *Lymphocytes T* : ils sont mis en jeu lors d'une *réponse immunitaire à médiation cellulaire*. Ils expriment à leur surface une molécule de liaison à l'antigène spécifique qu'on nomme récepteur des cellules T (TCR) qui, contrairement aux anticorps membranaires des cellules B, ne peut reconnaître l'antigène que lorsqu'il est lié à des protéines de la membrane cellulaire appelées molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe deux sous-populations bien définies de cellules T :
 - les cellules T auxiliaires (T_H , de *helper*) qui présentent à leur surface des glycoprotéines membranaires CD_4 . Ces cellules sont restreintes à la reconnaissance d'un antigène lié à une molécule de classe II du CMH et sont aussi appelées CD_4^+ .
 - Les cellules T cytotoxiques (T_C , de *cytotoxic*) qui présentent à leur surface des glycoprotéines membranaires CD_8 . Ces cellules sont restreintes à la reconnaissance d'un antigène lié à une molécule de classe I du CMH et sont aussi appelées CD_8^+ .

Nb : les molécules du CMH se divisent en deux classes :

- les molécules de classe I du CMH sont exprimées par quasiment l'ensemble des cellules nucléées,
- les molécules de classe II du CMH ne sont exprimées que par les cellules présentatrices de l'antigène.

➤ **Les cellules présentatrices de l'antigène (APC)** sont des cellules spécialisées telles que les macrophages, les cellules B ou les cellules dendritiques (les plus efficaces). Elles présentent au niveau de leur membrane des molécules de classe II du CMH et elles sont capables de délivrer un signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des cellules T_H (Figure 2).

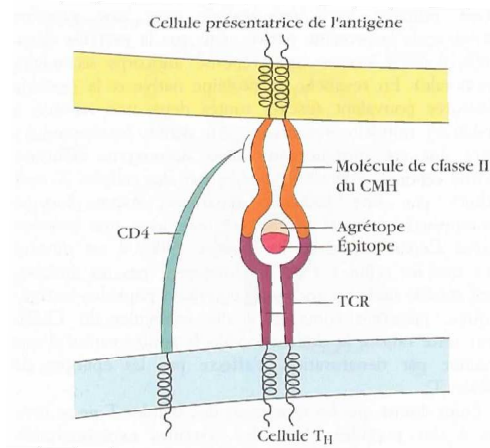


Figure 2 – Présentation de l'antigène¹

Les réponses immunitaires *humorale* et à *médiation cellulaire* requièrent l'activation des cellules T_H (Figure 3). Dans un premier temps, les cellules présentatrices de l'antigène internalisent l'antigène par phagocytose ou par endocytose. Ce dernier est dégradé en petits peptides antigéniques qui sont associés à des molécules de classe II du CMH pour donner des complexes peptide-molécule de classe II du CMH externalisés à la surface des APC. On appelle ces étapes « apprêtement » et « présentation » des antigènes. Le processus d'activation débute quand les récepteurs de liaison à l'antigène des cellules T_H reconnaissent les complexes peptides-molécule de classe II du CMH et s'y lient. Cette interaction, doublée d'un signal de co-stimulation émanant de la cellule présentatrice de l'antigène, entraîne l'activation et la prolifération des cellules T_H spécifiques de l'antigène qui permettent la création des réponses humorales et à médiation cellulaire.

- **Réponse immunitaire humorale** : l'interaction d'une cellule B avec l'antigène par l'intermédiaire d'un récepteur déclenche son activation, sa prolifération et sa différenciation. Après apprêtement de l'antigène, la cellule B présente à sa surface les peptides qui en résultent, associés à des molécules de classe II du CMH. Une cellule T_H spécifique du complexe antigène-CMH présenté se lie à ce dernier ce qui provoque la sécrétion, par la cellule T_H , de cytokines qui ont pour but de stimuler les différentes phases de la division et de la différenciation de la cellule B en plasmocytes sécrétant l'anticorps spécifique de l'antigène et en cellules B à mémoire.
- **Réponse immunitaire à médiation cellulaire** : elle débute par l'activation de cellules T par un antigène spécifique via une APC. Ces cellules sécrètent alors des cytokines qui contribuent à l'activation de différentes cellules T effectrices, responsables de la réponse à médiation cellulaire. Par exemple, après avoir internalisé un antigène, une cellule présentatrice de l'antigène (APC), le présente à sa surface sous forme d'un complexe avec une molécule de classe I du CMH. Après qu'une cellule T_C se soit liée à ce complexe, les cytokines (interleukine IL_2 – Figure 3) vont stimuler la prolifération et la différenciation de cette cellule T_C à mémoire et en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui engendreront la lyse de la cellule présentant l'antigène comme une cellule du Soi altérée.

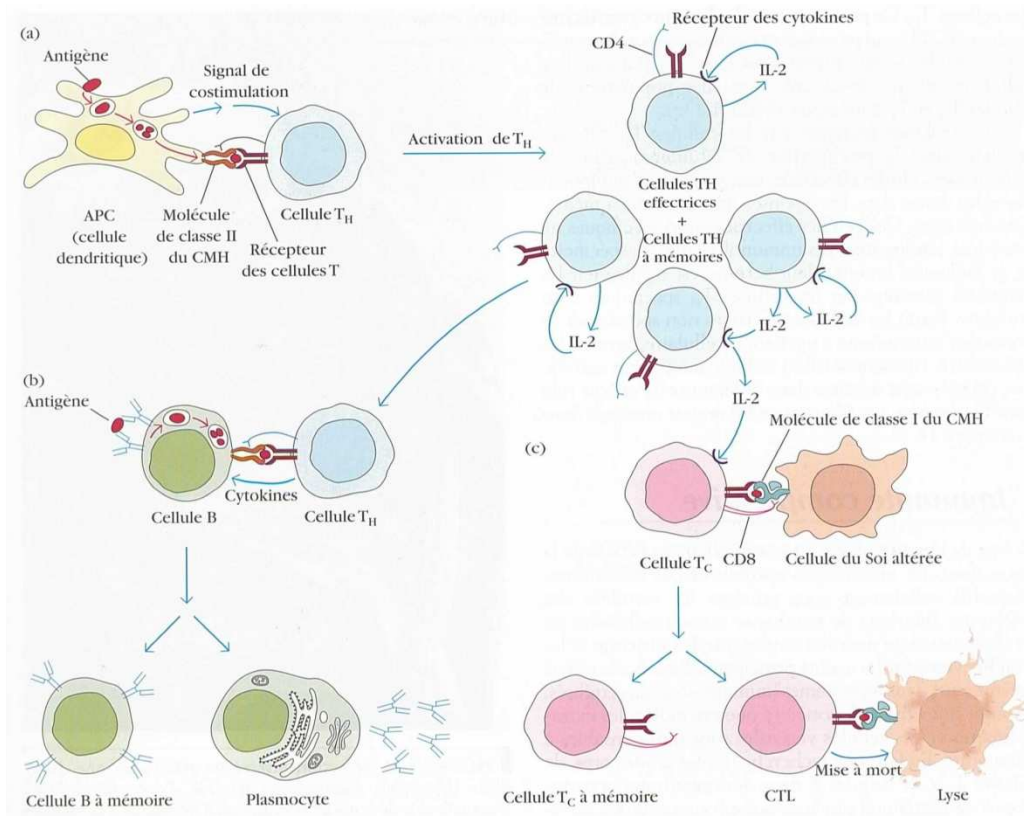


Figure 3 – Présentation de l'antigène (a) et réponse immunitaire humorale (b) et à médiation cellulaire (c)¹

ii- Immunoglobulines – Anticorps monoclonaux

Les immunoglobulines sont des anticorps. Ce sont les protéines présentes à la surface des cellules B qui confèrent à ces dernières leur spécificité antigénique mais ce sont aussi les protéines sécrétées par les plasmocytes. Les anticorps sécrétés circulent dans le sang et servent d'effecteurs de la réponse immunitaire humorale en recherchant, en neutralisant ou en marquant les antigènes en vue de leur élimination. Les antigènes sont structurellement complexes et peuvent contenir différents déterminants antigéniques. C'est pourquoi le système immunitaire répond par la production d'anticorps spécifiques de certains de ces épitopes, ce qui nécessite la participation de plusieurs clones de cellules B qui produisent alors des anticorps dits monoclonaux. Ces derniers se lient spécifiquement à un seul déterminant antigénique. La réponse anticorps polyclonale du sérum est constituée de l'ensemble de ces anticorps monoclonaux. Ces derniers ont, par ailleurs, de nombreuses applications dans le domaine du diagnostic et de la thérapeutique.

Les immunoglobulines ont une structure de base commune (Figure 4), formée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères (L) et deux chaînes lourdes (H). Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par une liaison disulfure covalente et par un

ensemble d'interactions non covalentes (liaisons salines, liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes). Les deux ensembles chaîne légère-chaîne lourde sont eux-mêmes liés entre eux par le même type de liaison et interactions.

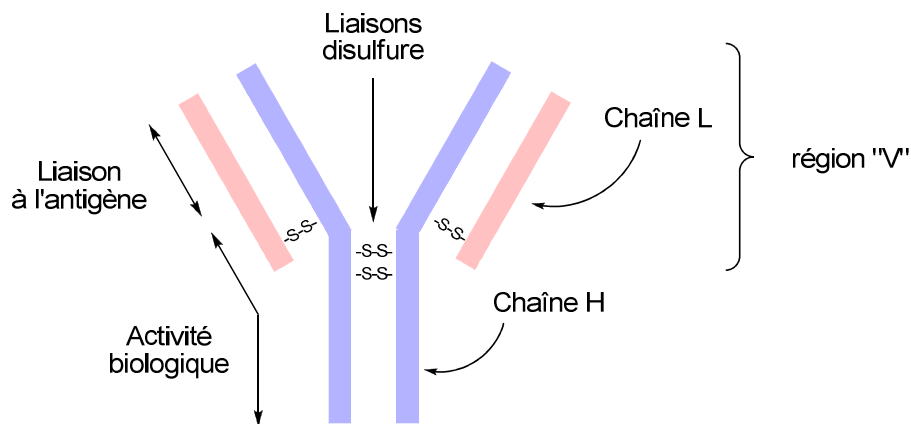


Figure 4 – Représentation schématique de la structure d'un anticorps

La spécificité des différents anticorps repose sur les différences dans la séquence des acides aminés des régions, dites régions « V » pour « variables ». Ce sont ces zones qui sont impliquées dans l'interaction avec un antigène.

Il existe un certain nombre d'immunoglobulines. On peut citer l'immunoglobuline G (IgG) qui est la plus abondante dans le sérum et qui représente 80% des immunoglobulines totales. L'immunoglobuline M (IgM) représente 5 à 10% des immunoglobulines du sérum. Elle est exprimée sous forme d'anticorps membranaires des cellules B lorsqu'elle est monomérique et elle est sécrétée par les plasmocytes sous forme pentamérique. Elle constitue la première classe d'immunoglobuline à être sécrétée lors d'une réponse primaire à un antigène.

iii- Reconnaissance de l'antigène – Notion d'épitope

Les antigènes sont les substances capables d'induire la réponse immunitaire spécifique.

Il convient de différencier les termes immunogénicité et antigénicité. Ce sont deux propriétés immunologiques bien distinctes.

- L'immunogénicité est la capacité à induire une réponse immunitaire (humorale et/ou à médiation cellulaire). Ainsi, un antigène étant une substance induisant une réponse immunitaire, il conviendrait de le nommer plutôt immunogène.
- L'antigénicité caractérise une substance capable de se combiner de manière spécifique avec les produits finaux des réponses immunitaires (humorale et/ou à médiation cellulaire) tels que les anticorps et/ou les récepteurs cellulaires.

Les antigènes peuvent être des molécules complexes et volumineuses. Ainsi les lymphocytes B et T n'en reconnaissent qu'une partie. Ces sites particuliers, appelés déterminants antigéniques ou épitopes, sont les régions immunologiquement actives de l'antigène. C'est par l'intermédiaire de ces régions actives que s'établit la liaison entre un antigène et un récepteur membranaire spécifique. Comme évoqué précédemment, les cellules B reconnaissent l'épitope seul alors que les cellules T ne reconnaissent l'épitope que lorsqu'il est associé à une molécule du CMH à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène ou d'une cellule du Soi altérée.

Ainsi, la branche humorale permet la reconnaissance d'un grand nombre d'épitopes, qu'ils soient exposés à la surface de bactéries et de particules virales, ou qu'ils soient présents sur des protéines solubles, des glycoprotéines, des polysaccharides ou des liposaccharides issus de pathogènes. La branche à médiation cellulaire ne permet que la reconnaissance d'épitopes des protéines exposées par des molécules du CMH à la surface de cellules du Soi ou de cellules du Soi altérées comme les cellules infectées par un virus ou les cellules cancéreuses.

b- Le cancer – Origines

Lorsque l'équilibre entre le renouvellement et la mort cellulaire n'est plus respecté et que certaines cellules ne répondent plus aux mécanismes normaux de régulation de la

croissance cellulaire, ces dernières engendrent des clones de cellules qui peuvent atteindre des tailles considérables et conduire à une tumeur.

Le terme de cancer fait référence à une tumeur maligne qui a la capacité de croître et de devenir invasive, au contraire d'une tumeur bénigne qui ne croît pas indéfiniment et qui n'envahit pas les tissus sains environnants. Les tumeurs malignes peuvent donner naissance à des métastases, petits groupes de cellules cancéreuses qui quittent la tumeur, diffusent par les vaisseaux sanguins et lymphatiques et peuvent ainsi se fixer et proliférer dans d'autres tissus pour donner des tumeurs secondaires. On appelle carcinomes les tumeurs qui se développent dans les tissus endodermiques ou ectodermiques (peau, bordure épithéliale des organes internes, glandes). Ainsi la majorité des cancers du colon, du sein, de la prostate et du poumon sont des carcinomes. Plus de 80% des tumeurs sont des carcinomes.

Deux types d'antigènes ont été identifiés sur des cellules tumorales : des antigènes spécifiques de tumeur et des motifs antigéniques qui existent également sur les cellules saines.

2- Glycosylation et cancer

La glycosylation est un phénomène universel qui occupe une place privilégiée au sein des douze modifications post-traductionnelles identifiées à ce jour. Une modification post-traductionnelle est une modification chimique d'une protéine, réalisée le plus souvent par une enzyme, après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Il existe un grand nombre de combinaisons possibles dans la construction des chaînes de carbohydrates, à l'origine notamment de leur diversité et de leur possible ramification. Ceci permet d'aboutir à la formation de motifs nouveaux et très différents les uns des autres, ce qui confère aux molécules porteuses de glycanes une grande diversité d'un point de vue structural et donc fonctionnel.²

La glycosylation permet la synthèse de biomolécules telles que les glycoprotéines et les glycolipides. Les glycoprotéines sont largement présentes dans tous les organismes vivants (animaux, plantes, champignons, bactéries) et consistent en des molécules telles que les enzymes, hormones, cytokines, anticorps. Ce sont des molécules aussi bien de surface qu'intracellulaires.

Il existe deux grands types de glycosylation : la *O*-glycosylation, mettant en jeu les groupes hydroxyles des acides aminés de type sérine et thréonine, et la *N*-glycosylation où intervient la fonction amine des résidus asparagine.³

Les *N*-glycanes sont classés en deux catégories principales:

- type *N*-acétylactosamine où on trouve des sucres tels que : *N*-acétyl-D-glucosamine, D-Mannose, D-Galactose, L-Fucose, et acide sialique
- type oligomannoses combinant de la *N*-acétylglucosamine avec des résidus D-Mannose.

Les *O*-glycanes sont également classés en deux catégories selon la nature du premier sucre lié à l'acide aminé (sérine ou thréonine) de la protéine :

- type non mucine : les premiers sucres liés sont principalement le fucose, le glucose ou la *N*-acétylglucosamine.
- type mucine : le premier sucre lié est la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) et la plupart des résidus sérine et thréonine sont glycosylés.

Les composés *O*-glycoconjugués ont des influences très variées et à différents niveaux. Par exemple, ils agissent sur la distribution des molécules d'eau, influençant ainsi la composition de l'environnement cellulaire. Ils agissent aussi en modifiant les forces intermoléculaires de type Van der Waals et les liaisons hydrophobes de différentes molécules. On peut également évoquer leur rôle dans l'agrégation des protéines ou dans la protection de chaînes polypeptidiques vis-à-vis des processus protéolytiques et thermiques. Par ailleurs, ils interviennent dans les processus tels que l'immunodifférentiation, l'adhésion cellulaire et la régulation cellulaire.^{4,5,6} Dans la majeure partie des cas, la sélectivité biologique des ces glycoconjugués est assurée par les résidus glycaniques.³

a- Glyprotéines de type mucines

Les mucines (MUC) sont les composants macromoléculaires majoritaires du mucus.⁷ Ce sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (>500 kDa) produites par les cellules épithéliales des conduits et des lumens du corps humain.

Elles jouent un rôle clé dans l'hydratation des surfaces épithéliales qui est essentielle pour la lubrification et le fonctionnement intrinsèques des conduits. De plus, les mucines sont impliquées dans la protection des cellules épithéliales vis-à-vis des infections et des lésions.⁸ En outre, certains types de mucines semblent avoir un rôle essentiel dans des processus biologiques complexes tels que le renouvellement et la différenciation des cellules épithéliales, dans les signaux cellulaires ainsi que dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.⁹

La biosynthèse des mucines commence par la liaison entre une *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) et un résidu sérine ou thréonine sous l'action d'une famille d'enzymes de type polypeptide α -GalNActransférases.¹⁰ Cette structure GalNAc- α -*O*-sérine/thréonine est le bloc

commun pour la construction des différents « cores », structures de base, dont la synthèse met en jeu un très grand nombre d'enzymes de type glycosyltransférases. Les mucines sont des protéines hautement glycosylées (Figure 5), essentiellement *O*-glycosylées, où les chaînes glycaniques peuvent atteindre 80% de la masse moléculaire totale de la glycoprotéine.¹¹

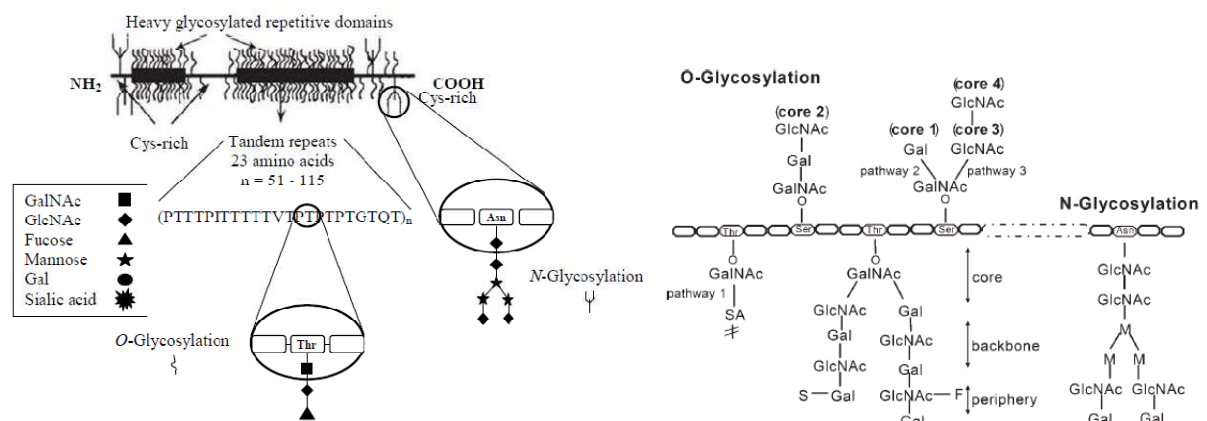


Figure 5 – Structure des mucines⁷

En fonction de leurs caractéristiques et de leur devenir physiologique, les mucines sont classées en deux groupes : les mucines sécrétées et les mucines liées aux membranes.

Dans ce dernier groupe se trouvent les mucines MUC1, du nom du gène codant pour leur formation. Il ne s'agit pas d'une mucine classique, mais d'une glycoprotéine transmembranaire détectée pour la première fois dans le lait humain.¹⁰ Les MUC1 sont exprimées sur les surfaces apicales des épithélia simples et glandulaires, tels que les glandes salivaires, le pancréas ou le sein. On les retrouve également sur des cellules circulantes telles que les cellules T¹² et les cellules dendritiques activées.¹³ Il a été prouvé que le domaine extracellulaire était formé d'un nombre variable d'unités répétitives (*tandem repeats* TRs) de 20 acides aminés, chacun de ces TRs présentant 5 sites potentiels de *O*-glycosylation. La séquence d'un TR est la suivante :¹⁴

GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP

où les résidus S et T représentent les résidus sérine et thréonine, sites potentiels de *O*-glycosylation. Ainsi les TRs sont couverts de structures glycaniques, hautement ramifiées et complexes.

b- Antigènes saccharidiques associés aux tumeurs

Les transformations associées au développement des cellules sont nombreuses et variées. Elles peuvent, entre autres, concerner les processus de glycosylation précédemment évoqués. Du fait de leur grande variété fonctionnelle, on comprend aisément qu'une altération chronique ou permanente de la production des mucines et/ou des modifications dans leurs caractéristiques biochimiques puisse avoir des conséquences graves sur le comportement et le devenir d'une cellule. Ainsi, des modifications dans leur expression et/ou des glycosylations aberrantes sont associées à différents types de pathologies et notamment au cancer. Il a été montré que la majorité des tumeurs présentaient des mucines dont l'expression avait été modifiée, mettant en évidence des dérèglements au niveau des processus de glycosylation.¹⁵ Ces dérèglements sont dus notamment à des dysfonctionnements des enzymes responsables de leur biosynthèse. On peut noter par exemple, dans des lignées cellulaires issues de cancers du sein, une augmentation du taux moyen de glycosylation des TRs due à un profil d'expression différent de la glycosyltransférase GalNAcT.^{10,16} La présence de ces mucines altérées et surexprimées à la surface des cellules tumorales a été corrélée avec une augmentation du potentiel cancéreux et à un mauvais pronostic pour les patients.

C'est dans les années 1980 que les MUC1 ont été considérées pour la première fois comme des marqueurs tumoraux du fait de leur détection dans le sérum de patients atteints de cancers du sein.¹⁷ Par la suite, une surexpression et des altérations structurales de ces glycoprotéines, issues de glycosylations aberrantes, ont été observées dans différents types de cancers (colon,⁷ prostate, sein, ovaires).⁸ Ensuite, plusieurs études ont montré l'implication directe des MUC1 en tant qu'oncogène dans de nombreux processus cancéreux ; la surexpression de ce type de mucines semble induire des transformations cellulaires et inhiber l'apoptose induite par le stress.^{18,19} Comme précédemment évoqué, les mucines, et en particulier les MUC1, sont impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire et d'interactions cellulaires. Les modifications structurales des MUC1, auxquelles s'additionne l'encombrement stérique conféré par les conformations étendues de ce type de glycoprotéines, semblent jouer un rôle dans le détachement des cellules cancéreuses des sites tumoraux originels. La présence d'antigènes associés aux tumeurs a pour effet de favoriser l'épanchement des cellules tumorales et leur dissémination en sites métastatiques éloignés. Enfin, la surexpression des MUC1 semble être à l'origine d'une protection accrue des cellules tumorales envers les lymphocytes T cytotoxiques activés (CTL).²⁰ Il existe ainsi des mécanismes biologiques qui rendent les cellules tumorales invisibles par le système

immunitaire et qui font qu'elles ne sont pas reconnues comme étant des cellules du Soi altérées.

Les modifications structurales des mucines ont pour conséquences de mettre en évidence à la surface des cellules tumorales des épitopes de type peptidiques sur le squelette de base des glycoprotéines et d'exposer des épitopes glycaniques, en temps normal masqués sur des cellules saines. Ces épitopes glycaniques associés à une tumeur¹⁷ sont appelés TACA (*Tumor-Associated Carbohydrate Antigen*). Les antigènes et séquences glycaniques représentés ci-dessous (Figure 6) présentent un intérêt particulier pour ce qui est du diagnostic, du pronostic et de la thérapeutique des cancers.²¹ Sont représentés ci-dessous, l'antigène monosaccharidique Tn et deux antigènes disaccharidiques sTn et TF (Thomsen-Friedenreich, également noté T). Suivent les oligosaccharides Globo H, GM2, Lewis Le^y et sLe^x. Les antigènes GM2 et sLe^x font partie de la famille des gangliosides et sont issus de sialylations prématurées.

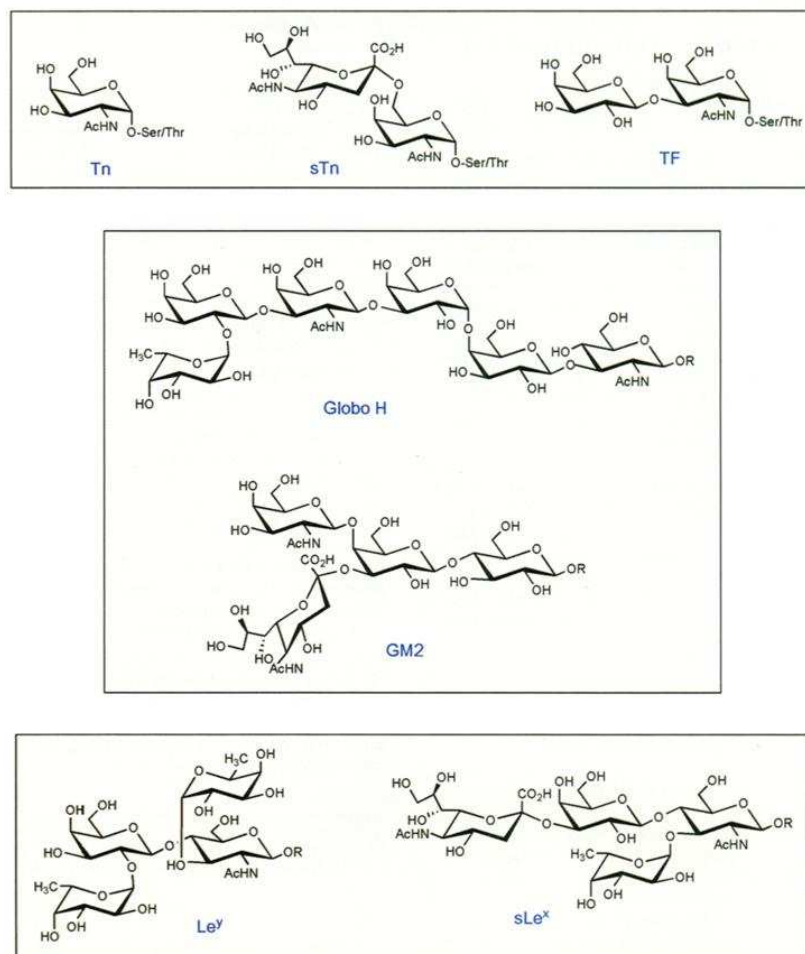


Figure 6 – Antigènes tumoraux²²

Le plus simple de ces antigènes est l'antigène Tn, résidu GalNAc- α -O-ser/thr. C'est un antigène carcinoembryonnaire, normalement présent au cours du développement et observé chez les embryons de 4 à 17 jours, particulièrement sur les tissus épithéliaux et mésothéliaux. Mais c'est aussi un marqueur immunogène présent dans environ 80% des tissus de la grande majorité des cancers. C'est un important autoimmunogène²³ et une molécule d'adhésion permettant la fixation de tumeurs sur des tissus sains.²⁴ Il s'exprime dans les cancers du fait de dysfonctionnement (absence/inactivité) de la β -3-galactosidotransferase qui permet la synthèse de l'antigène TF par addition d'un galactose lié en β 1 \rightarrow 3 sur GalNAc- α -O-ser/thr. Il est présent de manière très précoce dans beaucoup de cancers et il apparaît à des stades où les perturbations cytologiques sont encore discrètes.²

3- Vaccination anticancéreuse

a- Immunothérapie du cancer

La réponse du système immunitaire vis-à-vis d'une tumeur est, dans la plupart des cas, insuffisante pour empêcher son développement. En effet, bien que les chaînes glycaniques altérées rendent les cellules cancéreuses légèrement immunogènes, elles sont très rarement antigéniques.²⁵ De tels glycanes sont reconnus comme des éléments du « Soi » par le système immunitaire. Afin d'augmenter ou de compléter les mécanismes de défense naturelle, une approche thérapeutique prend alors toute son importance. Des études ont été menées dans ce sens. On peut citer par exemple la manipulation du signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des cellules T_H, précurseurs des CTL.²⁶ Des chercheurs ont par ailleurs montré chez la souris qu'une augmentation de l'activité des APC, telles que des cellules dendritiques activées, permettait une activation des cellules T_H et des CTL spécifiques des antigènes tumoraux et conférait par la suite une immunité vis-à-vis de la tumeur. Une autre approche reposerait sur l'utilisation de cellules tumorales génétiquement modifiées sécrétant des cytokines qui pourraient augmenter l'intensité de la réponse immunitaire contre elles.²⁷ On peut aussi citer l'utilisation d'anticorps monoclonaux comme agents immunothérapeutiques anticancéreux expérimentaux.²⁸ Vient enfin la vaccination, dont les éléments clés sont l'identification des antigènes tumoraux et le développement de stratégies efficaces pour la présentation de ces antigènes dans le but de déclencher une réponse immunitaire humorale et/ou à médiation cellulaire efficaces.

L'administration d'un vaccin anti-cancer a pour but d'induire une réponse de la part du système immunitaire, doublée d'une mémoire immunitaire. A ce jour, différentes approches vaccinales ont été tentées.

- *Vaccins de type peptidique.* On peut citer en exemple les travaux du groupe de Philip Livingston²⁹ qui a testé l'immunogénicité d'un 30-mer peptidique présentant la même séquence que les TRs de MUC1, associé à un adjuvant de type saponine QS-21.

De même, l'équipe du Dr Delmas a synthétisé un mime de MUC1, composé de seulement deux unités répétitives de MUC1 orientées en sens inverse et couplées à un épitope peptidique T-helper universel (PADRE). Il a été mis en évidence, chez la souris, que ce composé stimulait la production d'anticorps capables de se lier à une protéine recombinante MUC1 non glycosylée.³⁰

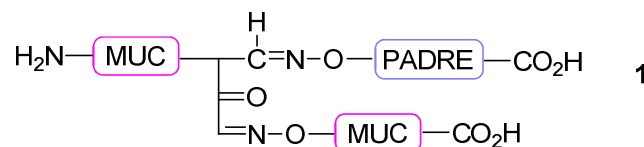


Figure 7 – Vaccin peptidique

- *Vaccins de type protéine fusionnée.* Le groupe d'Apostolopoulos³¹ a montré qu'une protéine fusionnée MUC1, formée de cinq MUC1 TRs conjugués à un polymère de type mannan (ciblant les récepteurs à mannose des APC), engendrait différentes réponses immunitaires chez des souris sauvages. Mais dans ce cas, les anticorps générés réagissent avec la partie non glycosylée des MUC1 et non pas avec les parties glycosylées semblables à celles présentes sur les cellules cancéreuses.
- *Vaccins à base d'ADN.* Ils consistent en l'internalisation d'ADN complémentaire (MUC1 cDNA), véhiculé par un plasmide ou un virus, par les cellules. Ceci a pour résultat l'apprêtement et la présentation par les molécules de classe I ou II du CMH. Des réponses spécifiques de MUC1 par les cellules T ont été observées chez des souris sauvages.

b- Candidats vaccins à base d'antigènes saccharidiques

Dans le cadre d'une approche immunothérapeutique du cancer, les différents TACAs précédemment évoqués deviennent des cibles de choix puisqu'ils apparaissent comme des marqueurs tumoraux. L'élaboration de vaccins de type glycoconjugués devrait donc permettre l'induction d'une réponse immunitaire plus efficace puisque cela permettrait de mimer la surface des cellules cancéreuses. Du fait de la faible immunogénicité intrinsèque des TACAs, il convient de construire un vaccin optimisé. En effet, ils sont peu capables d'activer les cellules T_H à eux seuls.

Depuis quelques années maintenant, plusieurs groupes de recherche travaillent sur l'élaboration de vaccins antitumoraux totalement synthétiques ou semi-synthétiques à base d'antigène saccharidiques. Les vaccins synthétiques présentent, en effet, plusieurs avantages. Ils ont, notamment, des structures chimiquement bien définies et des immunoadjuvants peuvent être associés directement aux structures, ce qui évite l'utilisation d'adjuvants externes.²⁵ On peut les classer en différentes catégories : les vaccins monovalents qui ne présentent qu'un seul d'antigène saccharidique et les vaccins multivalents (ou polyvalents) qui présentent plusieurs types d'antigènes différents ou plusieurs copies d'un même antigène.

– Vaccins monovalents

On peut citer en exemple des vaccins de première génération élaborés par Danishefsky où le TACA, le Globo-H, a été conjugué à une protéine transporteuse de type KLH (Keyhole-Limpet Hemocyanin) par l'intermédiaire d'un espaceur approprié.³²

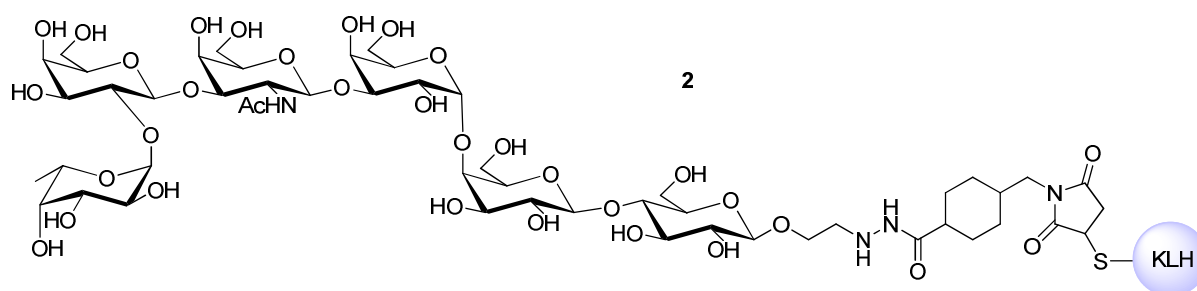


Figure 8 – Vaccin glycoconjugué monovalent de type *O*-glycoside

L'évaluation immunologique de ce composé chez la souris a permis de mettre en évidence la production d'immunoglobulines IgG et IgM ; les anticorps produits se sont avérés réactifs vis-à-vis de cellules cancéreuses MCF-7 présentant à leur surface l'antigène Globo-H et ont été capables d'induire la lyse de ces cellules.

On peut également citer l'exemple d'un composé monovalent préparé par Cipolla et al. dans lequel l'épitope B, l'antigène Tn, est introduit sous forme de C-glycoside.³³ Il a été montré que cette structure était présentée par les cellules dendritiques et reconnue par les cellules T spécifiques de l'épitope T (ici OVA).

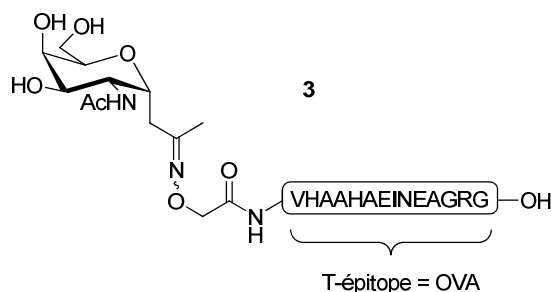


Figure 9 – Vaccin glycoconjugué monovalent de type C-glycoside

D'autres groupes ont proposé des vaccins multiépitoques et notamment le groupe de A. Delmas³⁴ qui a synthétisé un vaccin présentant les monosaccharides Tn et TF. Testé chez la souris, ce composé a déclenché la production d'anticorps capables de reconnaître les MUC1 natives associées à la tumeur, sur une lignée de cellules de cancer du sein.

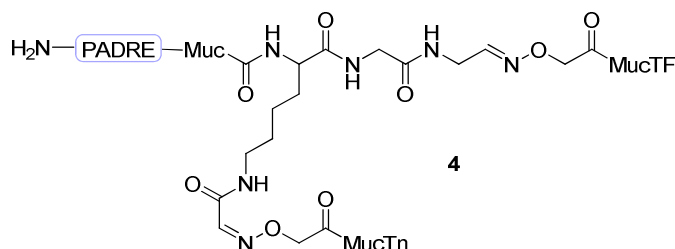


Figure 10 – Vaccin multiépitoque

– Vaccins multivalents mono- et multi-épitoques

Dans la famille des mucines, les épitoques de type carbohydate sont portés sur des résidus de sérine ou de thréonine adjacents organisés en « clusters » de deux à cinq épitoques. De plus, ces clusters semblent être des cibles privilégiées pour les anticorps monoclonaux. On peut donc envisager que mimer cet effet « cluster »³⁵ dans des vaccins synthétiques pourrait améliorer leur immunogénicité. En effet, les interactions polyvalentes sont caractérisées par la liaison simultanée de ligands multiples d'une unique entité biologique (molécule, surface) avec des récepteurs multiples.³⁶ Ces interactions présentent des caractéristiques particulières, inexistantes pour des interactions de type monovalent. Par exemple, des interactions polyvalentes peuvent être collectivement beaucoup plus fortes que l'ensemble des

interactions monovalentes correspondantes. Ce type d'interactions multivalentes est mis en jeu dans des phénomènes de liaison cellule-cellule ou cellule-molécule. La surface de la plupart des pathogènes invasifs, cellules tumorales comprises, est caractérisée par une répétition d'épitopes. La polyvalence entre alors en jeu afin d'augmenter les affinités de liaison à ces surfaces. Par exemple, les immunoglobulines sont des anticorps qui présentent plusieurs sites récepteurs équivalents. Ainsi, la liaison polyvalente de structures, telles que des antigènes ou d'autres ligands présents à la surface de bactéries, virus, parasites, cellules du non-Soi ou cellules du Soi altérées (cellules cancéreuses), semble être une caractéristique omniprésente de la reconnaissance immunitaire.

On a donc assisté à la naissance de vaccins totalement synthétiques de deuxième génération.

On peut prendre comme exemple le vaccin élaboré par Danishefsky où le cluster Tn(c) est lié à la protéine KLH déjà évoquée,³⁷ via un espaceur. L'évaluation immunologique de ce vaccin a montré chez la souris la production d'un taux élevé d'IgM et un taux modéré d'IgG. Des études complémentaires ont permis d'amener ce composé en phase II de tests cliniques chez l'homme.²¹

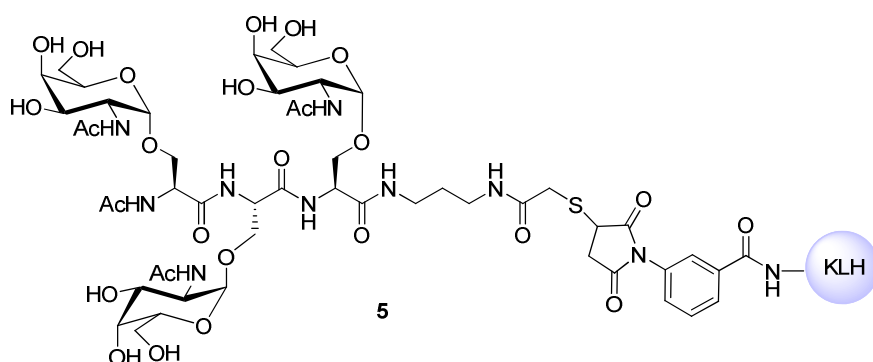


Figure 11 – Cluster monoantigénique sur une base de squelette peptidique

On peut aussi citer l'utilisation par Dumy d'une structure de type RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) comme structure pour la présentation de quatre copies d'antigène Tn.³⁸ Le glyco-lipopeptide est constitué d'un squelette peptidique cyclique porteur des quatre épitopes Tn. L'ensemble est couplé à un épitope hybride résultant de la combinaison d'un épitope des cellules T CD8+ (OVA, issu de l'albumine) et d'un épitope universel des cellules T_H CD4+ (PADRE). L'édifice est alors conjugué à un lipopeptide (Pam₃-Cys). Inoculée chez la souris, cette structure a induit la production d'IgG et IgM spécifique du RAFT, ainsi que des cellules T CD8+ et T CD4+,

respectivement spécifiques des épitopes OVA et PADRE. Le traitement de souris porteuses de tumeurs par ce candidat vaccin a permis de réduire la masse tumorale.

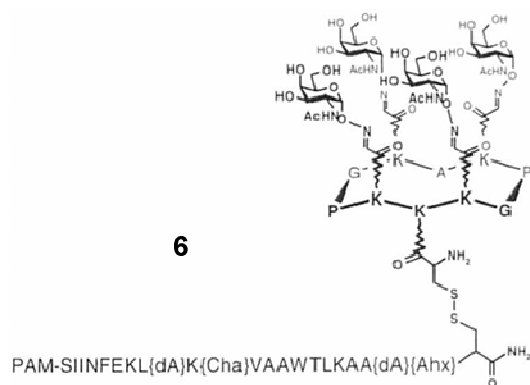


Figure 12 – Cluster monoantigénique de type RAFT peptidique

On trouve également, dans la littérature, des vaccins multi-antigénique (MAG) de type dendrimérique comme le MAG:Tn3-PV développé par C. Leclerc et coll.³⁹ Testé sur des lignées cellulaires humaines et animales, ce vaccin a généré une production d'anticorps reconnaissant les cellules tumorales exprimant l'épitope Tn.

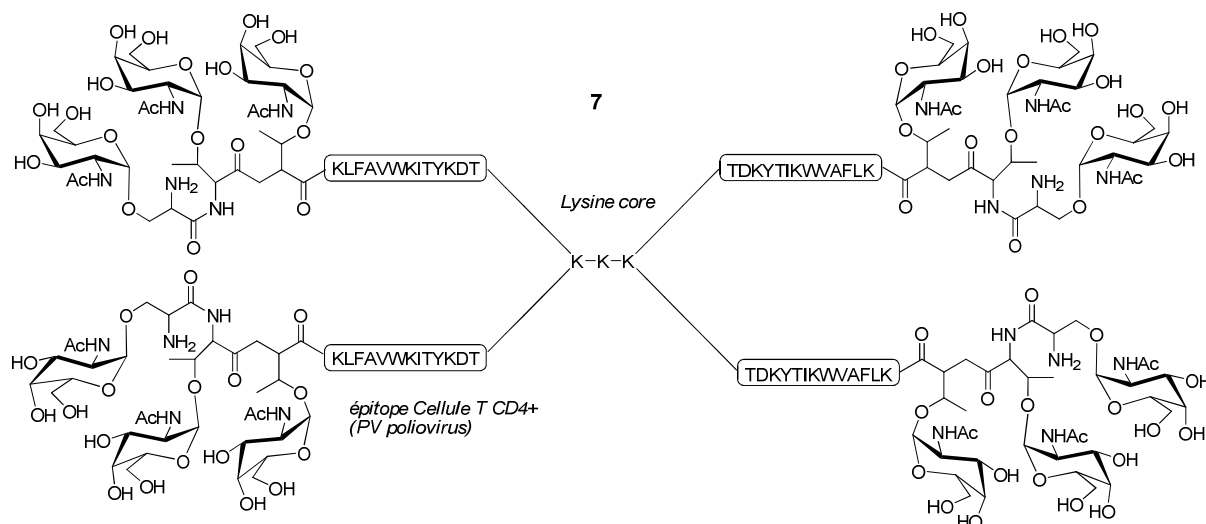


Figure 13 – Cluster monoantigénique de type dendrimérique

De manière plus ponctuelle, on trouve également des exemples de candidats vaccins dont le squelette porteur des antigènes n'est pas de nature peptidique. Il s'agit dans l'exemple suivant d'un « scaffold » de type calix[4]arène qui présente quatre copies du saccharide Tn.⁴⁰ L'édifice obtenu est couplé au lipopeptide Pam₃-Cys. L'immunogénicité de cette structure a été testée *in vivo* chez la souris et il a été montré qu'elle stimulait la production d'IgG anti-Tn.

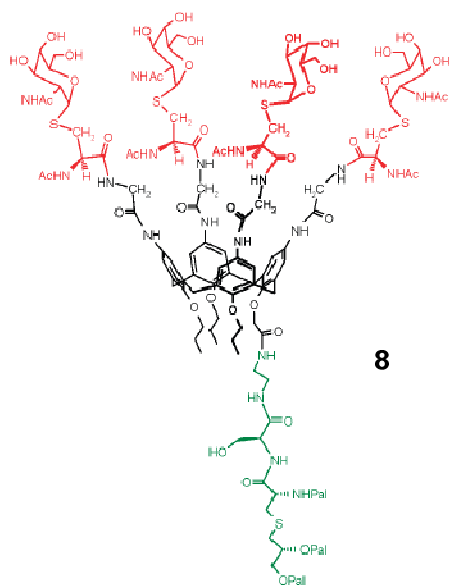


Figure 14 – Cluster monoantigénique de type calix[4]arène

La littérature rapporte également des exemples de vaccins anticancéreux présentant des antigènes de différentes natures sous forme de cluster. A nouveau, on peut citer le groupe de Danishefsky qui a évalué le potentiel immunogène de la structure suivante (Figure 15), présentant les antigènes Globo-H, Lewis^y et Tn.⁴¹ Une production élevée d'IgG et d'IgM a été détectée dans le sérum de souris immunisées avec ce vaccin multiépitopique.

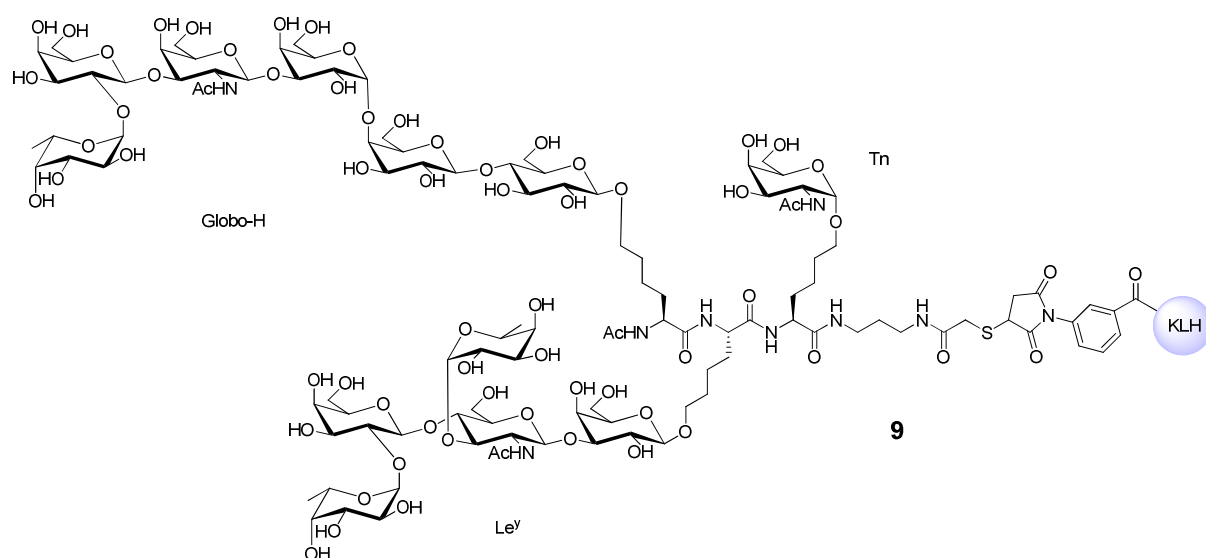


Figure 15 – Cluster multivalent multiépitopique

La liste des vaccins présentés ci-dessus est loin d'être exhaustive mais permet d'apprécier la diversité des vaccins anticancéreux synthétiques existants à ce jour, dont certains sont en phase d'essais cliniques avancés. La plupart du temps, ces vaccins glycoconjugués sont basés sur des chaînes α -peptidiques. Peu d'exemples sont rapportés dans la littérature de vaccins glycoconjugués anticancer à base de β -peptides.

Au-delà de leur utilisation comme structure de base pour d'éventuels vaccins anticancer, les β -peptides présentent une forte tendance à adopter des structurations secondaires. Nous allons donc nous intéresser à cette catégorie d'oligomères issus de β -aminoacides.

II- Les β -peptides

1- Généralités

a- Les β -aminoacides

i- Les différents types d'aminoacides

Les aminoacides naturels sont caractérisés par une grande diversité. Dans la nature, les acides aminés protéinogéniques (issus de la digestion des protéines) sont au nombre de vingt. Ce sont des α -aminoacides dont deux d'entre eux, l'acide (L)-aspartique et l'acide (L)-glutamique, peuvent être également considérés respectivement comme un β et γ aminoacides. Les aminoacides naturels protéinogéniques sont tous de configuration L (*S*), sauf la cystéine, de configuration (*R*). De manière générale, plus la chaîne carbonée est longue, plus les aminoacides se raréfient dans la nature, ce qui fait que les α et β aminoacides sont les plus abondants. La figure suivante (Figure 16) présente les principaux types d'aminoacides, naturels ou synthétiques.

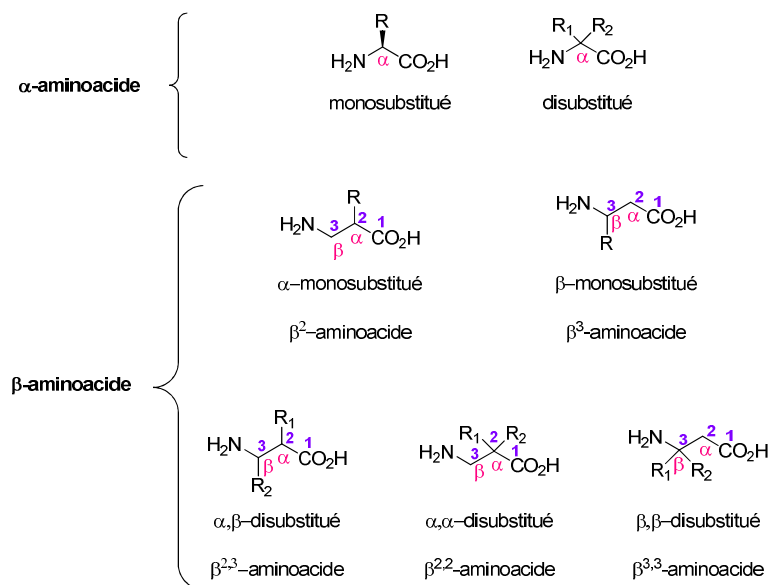
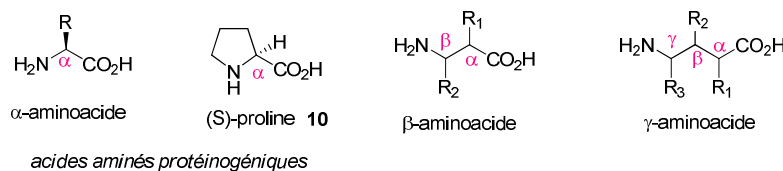


Figure 16 – Classes d’acides aminés et substitution

Les β -acides aminés permettent une grande variété de substitution du fait de la présence d’un carbone additionnel entre les fonctions acide et amine. En cela, ils diffèrent des α -acides aminés qui ne peuvent être que mono- ou disubstitués en position α sur l’atome de carbone C^2 . Les β acides aminés, eux, peuvent donc être mono- ou disubstitués en position α et/ou β , c’est-à-dire sur les carbones C^2 et/ou C^3 . Le plus simple des β -acides aminés est l’acide β -aminopropionique (β -alanine) : il ne présente aucune substitution latérale. Afin de distinguer les différents isomères possibles, Seebach⁴² a proposé les termes de β^2 - et β^3 -acide aminé, où les chiffres 2 et 3 indiquent la position de la chaîne latérale. Depuis, cette classification est devenue une convention dans la dénomination des β -acides aminés.

ii- Exemples de β -acides aminés

A l’état naturel, les β -acides aminés se présentent soit sous forme libre soit, dans la grande majorité des cas, comme constituants de composés naturels (peptides, cyclopeptides, depsipeptides, glycopeptides, alcaloïdes ou terpénoïdes). Ils ont été rencontrés dans des espèces procaryotes (marines et terrestres) et dans des organismes eucaryotes (plantes, champignons, animaux), ces derniers les incorporant, par exemple, comme métabolites secondaires servant à assurer leur survie.⁴³

On peut citer quelques β -acides aminés existant naturellement à l’état libre : la β -alanine (isolée de cyanobactéries), la L- β -lysine (isolée de bactéries *Methanogenium cariaci* notamment) ou encore la L- β -arginine (isolée de bactéries *Streptomyces griseochromogenes*) :

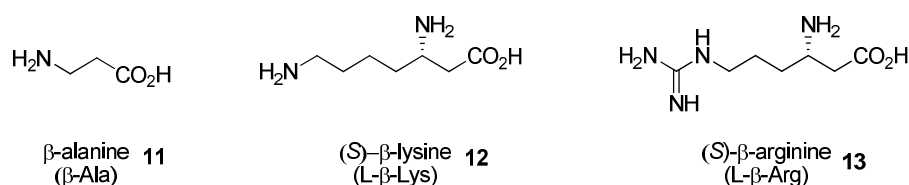


Figure 17 – Exemples de β -acides aminés naturels isolés sous forme libre

Les β -acides aminés existent également sous forme associée dans des composés naturels (Figure 18 et Figure 19).

On peut donner en exemple l’antibiotique TAN-1057 A, dont la structure inclut un résidu β -Arg. Ce composé présente une activité intéressante vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline.⁴³

Le Taxol® (paclitaxel), bien connu pour son activité antitumorale, présente une chaîne latérale de type phenylisoserine.⁴³

Les streptothricines sont des antibiotiques glycoconjugués à large spectre, qui sont utilisés, de nos jours, comme marqueur de sélection en biologie moléculaire.⁴³

On retrouve également des motifs β -aminoacides dans les composés macrocycliques tels que la jaspamide présentant un motif β -Tyrosine et qui a manifesté des activités antifongiques, cytotoxiques, antimicrobiennes et insecticides.⁴⁴

Les β -aminoacides peuvent aussi se présenter sous forme alicyclique ou cyclique. On peut citer comme exemple de β -aminoacide alicyclique la cispentacine, qui a montré des effets antibiotiques intéressants et qui peut être utilisée comme produit phytosanitaire.⁴³

Sous forme hétérocyclique de β -lactames, on trouve les motifs β -aminoacides dans les familles des pénicillines et des céphalosporines, qui présentent des propriétés antibiotiques mises à profit depuis longtemps.⁴³

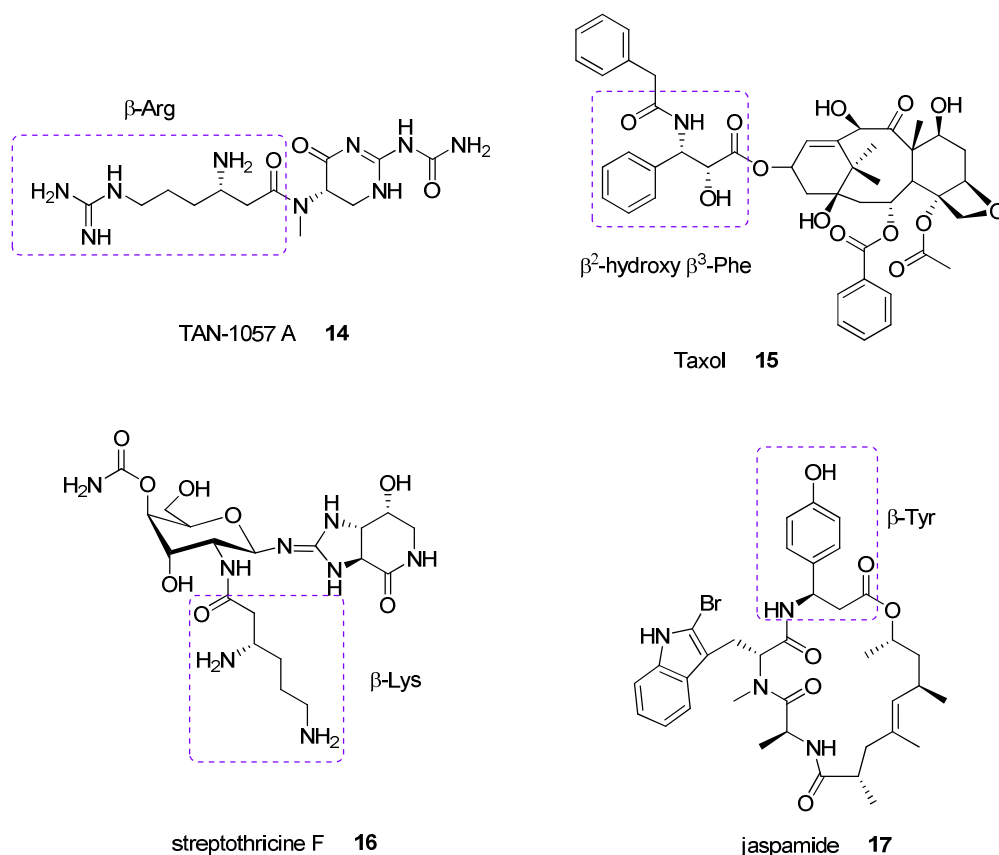


Figure 18 – Exemples de structures naturelles incorporant des résidus β -aminoacides

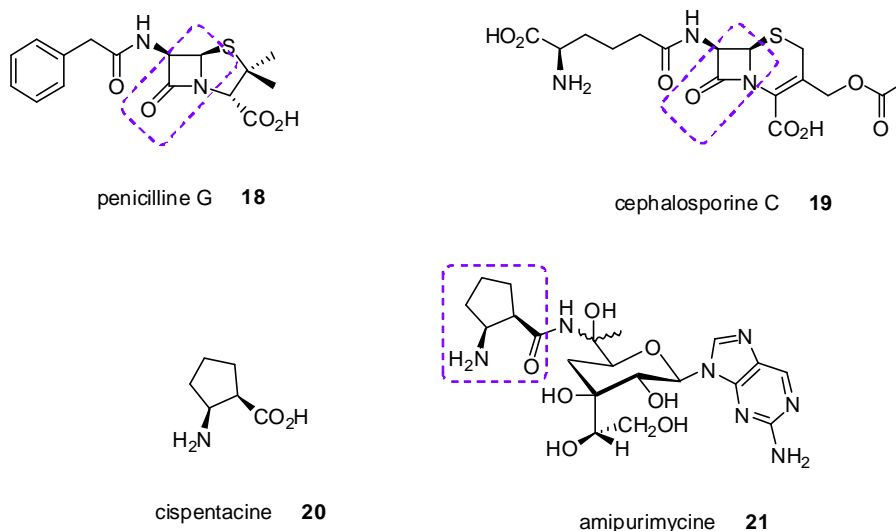


Figure 19 – Exemples de structures naturelles incorporant des résidus β -aminoacides

iii- Intérêt des β -peptides

On l'a vu, les β -aminoacides existent à l'état naturel et incorporés dans des structures plus complexes, notamment associés à des α -aminoacides, pour donner des composés aux caractéristiques biologiques souvent très intéressantes. Qu'en est-il des structures de nature essentiellement β -peptidiques et de leurs propriétés biologiques?

Les β -peptides sont des oligomères de β -aminoacides. Un certain nombre de polymères peptidiques naturels ont été identifiés et notamment le γ -peptidic poly[(*R*)-glutamic acid], découvert par Ivanovics et *al.* en 1937.⁴⁵ On le trouve chez certaines bactéries (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*) pour lesquelles il présente des fonctions de réserve. A notre connaissance, aucun polymère d'acide (L)-aspartique naturel n'a été répertorié. Ainsi, les β -peptides sont essentiellement d'origine synthétique.

Dans la plupart des processus biologiques, les α -peptides naturels peuvent interagir avec des protéines, avec des substrats d'enzymes, avec des biomacromolécules ou avec des sous-structures cellulaires. Mais ce sont des molécules relativement fragiles, notamment du fait de leur sensibilité vis-à-vis des protéases. Il est donc légitime de se demander dans quelle mesure les β -peptides pourraient être utilisés comme peptidomimétiques.

La première caractéristique des β -peptides est leur grande stabilité enzymatique.⁴⁶ On peut citer en exemple Seebach⁴⁷ et *al.* qui ont testé 15 peptidases sur 50 β -, γ -, α/β - peptides linéaires, cycliques, protégés ou non aux extrémités. Près de 300 expériences ont ainsi été réalisées et, de manière spectaculaire, dans aucun cas, la rupture d'une liaison entre deux β -

aminoacides n'a été observée. Les β -peptides se sont avérés également très stables *in vivo* chez le rat,⁴⁷ chez des larves d'insectes et sur des cultures de cellules de maïs.⁴⁸

Les activités antibiotiques de β -peptides amphiphiles ont été étudiées de manière exhaustive par DeGrado,⁴⁹ Gellman,⁵⁰ et Seebach.⁵¹ Certains β -peptides présentent des activités hémolytiques.⁵² Ils peuvent aussi être utilisés comme peptides antigéniques⁵³ ou encore comme mimes d'hormones.⁵⁴ On peut citer comme exemple l'utilisation de β -peptides comme analogues de la somatostatine, hormone peptidique constituée de 14 résidus aminoacides.^{54,55,56} Seebach, par exemple, a étudié chez l'animal les propriétés biologiques d'un β -térapeptide, comme analogue de la somatostatine. Les résultats très encourageants ont montré sa biodisponibilité et sa grande stabilité métabolique.

Des relations structure-activité très intéressantes ont été mises en évidence⁵⁷ après la découverte de la grande tendance des β -peptides à adopter des structurations secondaires.

2- Synthèse des β -aminoacides

a- Biosynthèse

Les β -aminoacides peuvent être synthétisés par différentes voies métaboliques chez le mammifère.

Une de ces voies consiste en la dégradation des bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN en β -Ala ou en β^2 -methyl-Ala. Les β -aminoacides peuvent aussi être obtenues par biosynthèse au départ d' α -aminoacides.

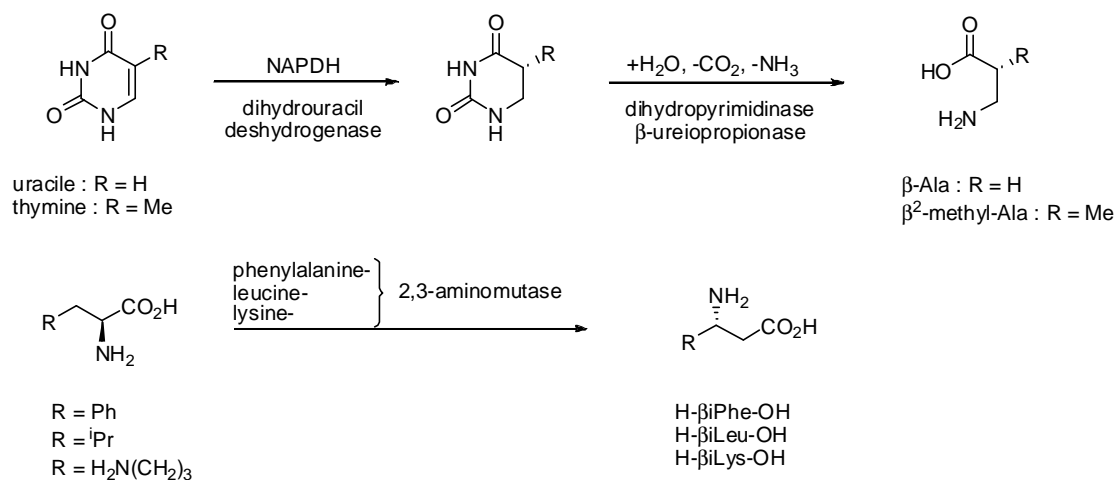


Schéma 1 – Exemples de biosynthèse de β -aminoacides

Les exemples de biosynthèse des β -aminoacides exposés ci-dessus sont loin d'être exhaustifs. La grande diversité structurale et chimique des β -aminoacides laissent aisément imaginer la diversité des voies de synthèse qui leur sont associées.

b- Obtention des β -aminoacides par voie chimique

Comme évoqué plus haut, la diversité structurale des β -aminoacides par rapport aux α -aminoacides est une évidence, l'atome de carbone supplémentaire du squelette augmentant de manière conséquente le nombre de structures possibles. Par ailleurs, rappelons que les β -aminoacides peuvent être β^2 - ou β^3 monosubstitués mais aussi $\beta^{2,2}$ -, $\beta^{2,3}$ -, $\beta^{3,3}$ - disubstitués.

Ainsi, mises à part les méthodes de dédoublement enzymatique, il en découle un très grand nombre de voies de synthèse. Les différentes voies d'accès à des β -aminoacides racémiques sont résumées sur la Figure 20. Le problème récurrent de ces méthodes réside dans la variabilité des excès énantiomériques des aminoacides obtenus. Sans dresser une liste exhaustive, nous donnerons l'exemple le plus significatif de synthèse énantiosélective.

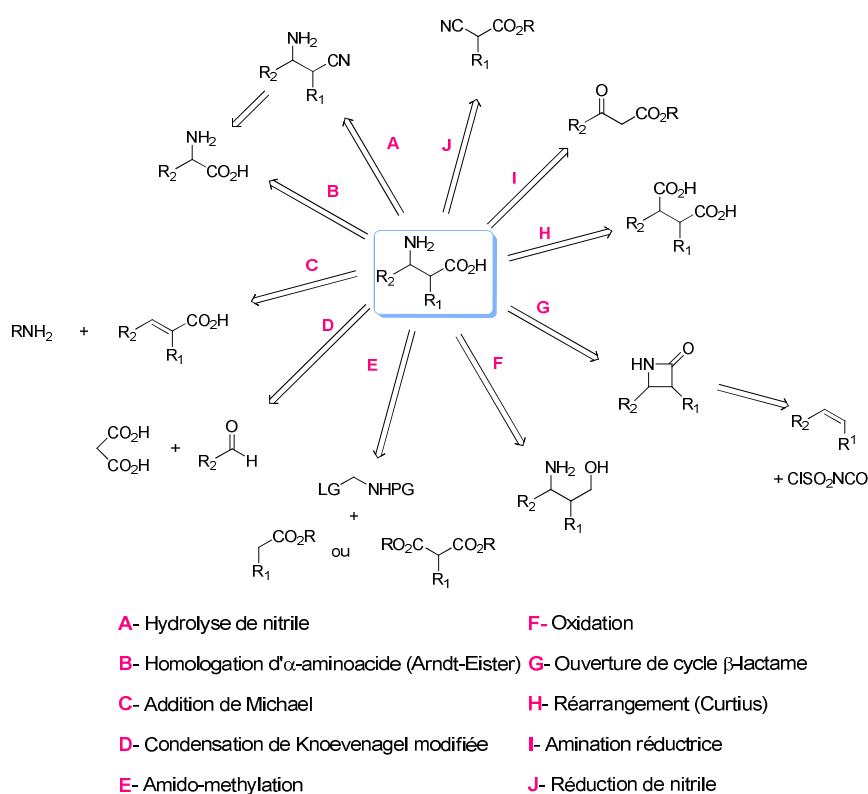


Figure 20 – Voies d'accès aux β -aminoacides par synthèse chimique

La méthode la plus employée de façon générale est l'homologation de Arndt-Eistert pour l'obtention de β^3 -aminoacides au départ d' α -aminoacides. Ces derniers sont des réactifs idéaux. En effet, s'ils existent à l'état naturel, ils peuvent être également obtenus par un grand nombre de voies de synthèse et présentent un centre stéréogène dont la configuration peut être retenue dans l'aminoacide homologué sans racémisation significative. La fonction acide carboxylique d'un composé (chlorure d'acide) réagit avec du diazométhane pour donner une diazocétone qui, sous traitement photolytique, thermolytique ou catalytique (Ag^+) en présence de nucléophiles protiques, subit un réarrangement de Wolff avec perte de N_2 , laissant le substrat homologué d'un groupe méthylène.

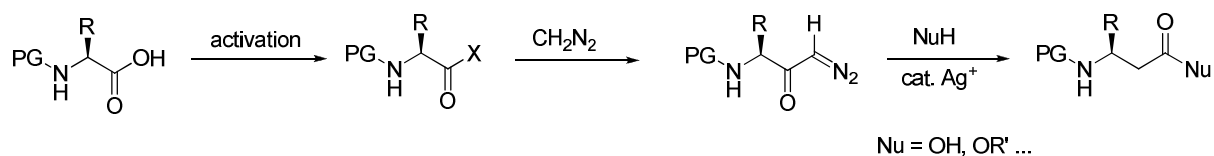


Schéma 2 – Homologation de Arndt-Eistert d' α -aminoacides

3- Propriétés de structuration des β -peptides

a- Notion de structuration secondaire

Les molécules oligomériques, totalement synthétiques, qui adoptent une structuration secondaire particulière sont appelées foldamères.

Le concept de « foldamère » a été énoncé la première fois par Gellman en 1998.⁵⁸ Ce terme caractérise tout oligomère ayant une forte tendance à adopter une conformation compacte bien définie et prévisible en solution. Cette structure est stabilisée par des interactions non covalentes et non adjacentes. Un foldamère est constitué d'une chaîne homo- ou hétéro-oligomérique, c'est-à-dire qu'il peut être issue de la répétition d'un unique résidu ou d'un enchaînement de résidus différents. Enfin, un aspect crucial et non négligeable est le caractère dynamique de la conformation. On peut, en effet, réellement parler de « réaction de repliement » pour décrire le phénomène faisant passer un oligomère d'un état désordonné à un état ordonné. Ce repliement a lieu en solution et la nature du solvant peut avoir alors une influence sur la modulation des liaisons non covalentes faibles mises en jeu.

b- Propriétés de structuration des β -peptides

De manière indépendante, les groupes de Seebach⁴⁶ et de Gellman⁵⁹ ont été les premiers à découvrir les propriétés biologiques et structurales insoupçonnées des β -peptides. Le groupe de Seebach a mis en évidence la structuration en hélice H-14 d'un β^3 -hexapeptide (H(- β -hVal- β -hAla- β -hLeu)₂-OH) en solution, soit dans le méthanol-d₄, soit dans la pyridine-d₅. Dans le même temps et indépendamment des travaux du groupe de Seebach, Gellmann a étudié des oligomères de β -aminoacides rigidifiés du *trans*-ACPC (acide *trans*-2-aminocyclopentylcarboxylique)^{60,61} et mis en évidence la formation d'hélice de type H-12. De manière générale, ils ont montré que de courts oligomères, présentant au minimum six résidus, pouvaient adopter des structurations secondaires particulières et notamment en hélice. On est donc loin des 15 résidus nécessaires pour la formation d'hélice à partir d' α -aminoacides dans les solvants protiques.⁶²

Il est donc apparu que la nature des β -aminoacides du squelette de l'oligomère pouvait avoir une influence cruciale sur les propriétés de structuration.

Nous allons donc brièvement passer en revue les principaux types de structurations secondaires observées sur des oligomères β -peptidiques, à savoir : hélices, feuillets et coudes.^{59,63}

Mais tout d'abord, voyons quelles sont les causes de structuration des β -peptides en hélices ou en feuillets. Le phénomène de repliement observé sur les oligomères β -peptidiques trouve son origine dans la conformation locale des β -aminoacides qui le composent. Malgré la présence d'un atome de carbone supplémentaire entre les fonctions amine et acide carboxylique qui introduit un angle dièdre supplémentaire, l'existence d'une conformation locale peut engendrer des préférences conformationnelles marquées. Dans la convention de Banerjee et Balaram,⁶⁴ les angles de torsion de la chaîne principale sont notés : ϕ , θ et ψ comme le montre la Figure 21.

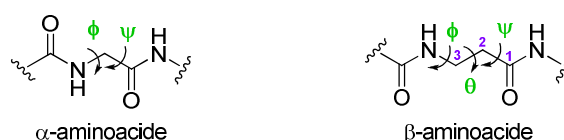


Figure 21 – Angles dièdres d'un α - et d'un β -aminoacides

Le repliement en hélice ou en feuillet nécessite une conformation de type gauche au niveau de l'angle dièdre θ , défini par la liaison C²-C³.

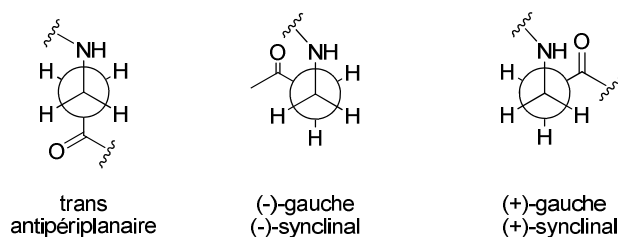


Figure 22 – Conformations de la liaison C²-C³

De nombreuses études ont été menées sur les effets des substituants sur la géométrie locale des β -aminoacides.^{65,66,67} (Figure 23)

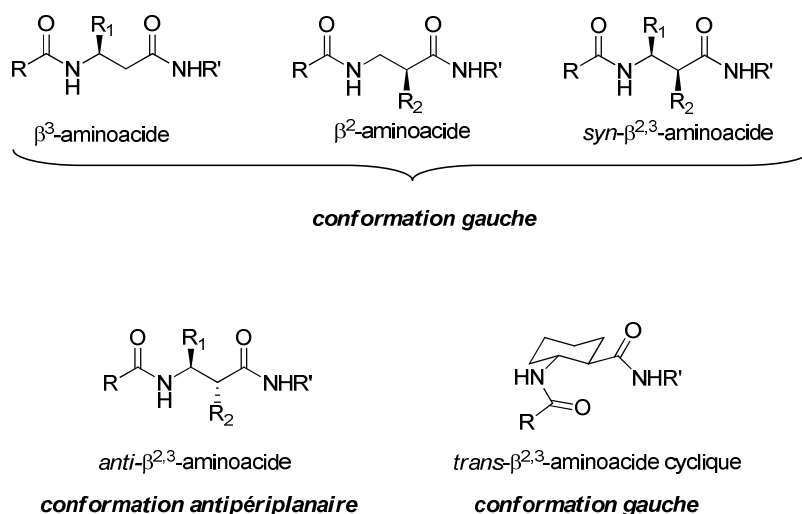


Figure 23 – Substitutions des atomes C² et C³ et conformations de la liaison C²-C³

Ainsi, si on se base sur ces considérations conformationnelles, tous les β -aminoacides sont susceptibles de se replier en hélices ou en feuillets, à l'exception des *trans*- $\beta^{2,3}$ -aminoacides dont la conformation relative antipériplanaire crée des gênes stériques défavorables, dues à la proximité spatiale des chaînes latérales. C'est-à-dire que lorsque les substituants en C² et C³ sont en position relative *anti*, la conformation *anti-périplanaire* de la liaison C²-C³ favorise la formation de structure en feuillet β . De même, les oligomères de β -aminoacides di-substitués $\beta^{2,2}$ - et $\beta^{3,3}$ - ne forment pas d'hélice.

i- Les hélices

Le repliement en hélice de la chaîne β -peptidique est dû à des interactions de type liaison hydrogène $N-H \cdots O=C$ entre le proton de la fonction amide d'un résidu i avec la fonction carbonyle d'un résidu $i \pm n$.

A ce jour, cinq types principaux d'hélices ont été identifiés⁶³ : l'hélice H-14, l'hélice H-12, l'hélice H-10, l'hélice H-10/12 et l'hélice H-8. Les liaisons hydrogènes mises en jeu sont récapitulées sur le schéma suivant :

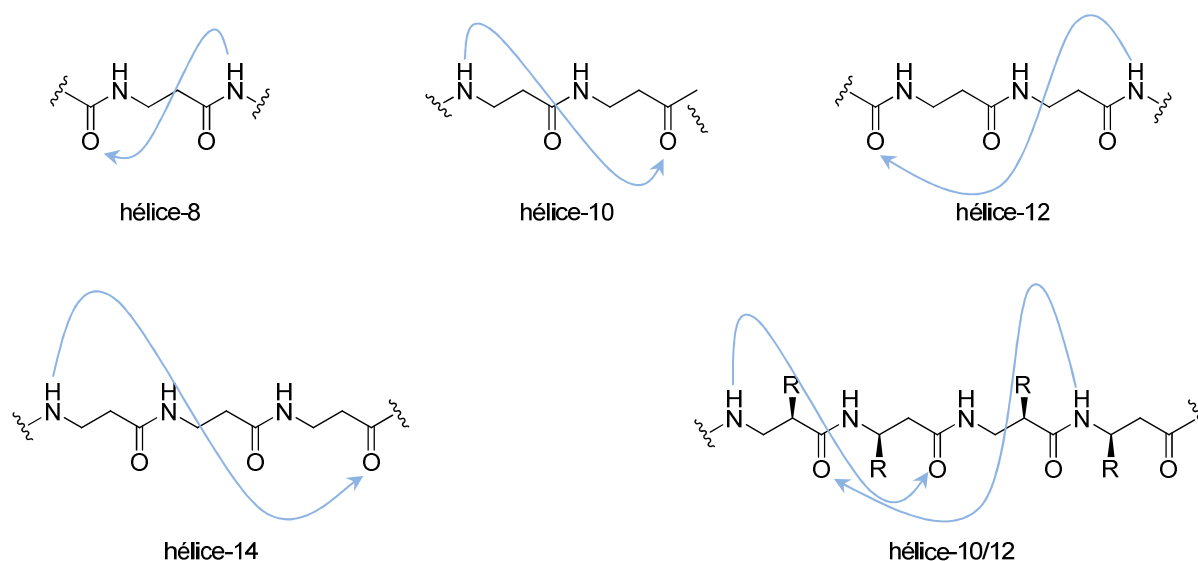


Figure 24 – Les différents types d'hélices observées à ce jour pour les β -peptides

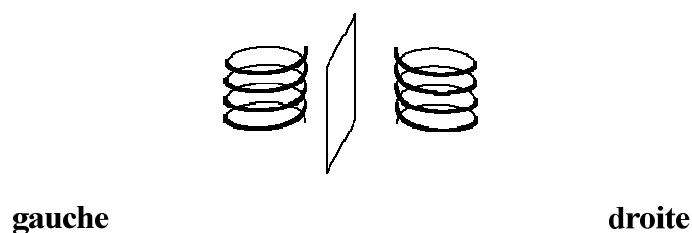
Le tableau ci-dessous récapitule les principales notations employées pour définir les hélices constituées de pseudocycles à 12 et 14 chaînons, notamment celles utilisées par Seebach et Gellman. Dans notre cas, nous adopterons la notation de Gellman.

Gellman	Seebach	Nomenclature des hélices
H-14	(P) 3_1	3_{14}
H-12	(P) 2.5_1	2.5_{12}
H-14	(M) 3_1	3_{14}
H-12	(M) 2.5_1	2.5_{12}

Gellman : nombre d'atomes inclus dans une boucle de l'hélice – **Seebach** : (P) et (M) = respectivement hélicité droite et gauche ; chiffres 3 et 2.5 = nombre de résidus par pas de l'hélice – **Nomenclature des hélices** : chiffres 3 et 2.5 = nombre de résidus contenus dans un pas de l'hélice ; chiffres 14 et 12 = nombre d'atomes inclus dans une boucle de l'hélice.

Tableau 1 – Système de notation pour les hélices à 12 et 14 chaînons

L'hélicité dépend de la stéréochimie des β -aminoacides constitutifs de l'hélice. On peut donc avoir des hélices d'hélicité gauche ou d'hélicité droite.



– Hélice-14

C'est le type d'hélice le plus répandu chez les β -peptides : les oligomères de β^2 -, de β^3 - et de *syn*- $\beta^{2,3}$ - aminoacides forment des hélices-14.⁶⁸ Les β^3 -peptides dérivants de L-aminoacides naturels forment des hélices H-14 d'hélicité gauche.

Ce type d'hélice est stabilisé par des liaisons hydrogène entre le proton NH_i de l'amide d'un résidu i avec le carbonyle CO_{i+2} du résidu $i+2$ pour former des boucles incluant 14 atomes. La liaison hydrogène est dirigée dans le sens *extrémité N-terminale* \rightarrow *extrémité C-terminale* formant ainsi un macrodipôle orienté dans cette direction.

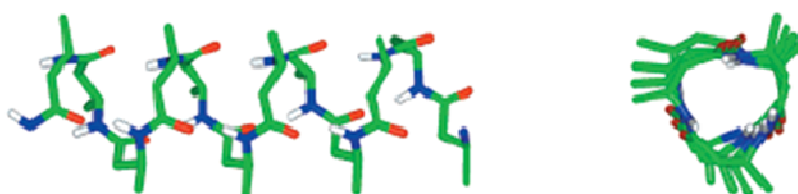


Figure 25 – Hélice H-14

Comme évoqué précédemment, Seebach et coll. ont été les premiers à trouver une structuration en hélice H-14.⁴⁶ L'étude portait sur l'hexapeptide $^3\text{HN}-(\beta\text{-hVal}-\beta\text{-hAla}-\beta\text{-hLeu})_2\text{-OH}$, constitué exclusivement de β -aminoacides de configuration (*S*).

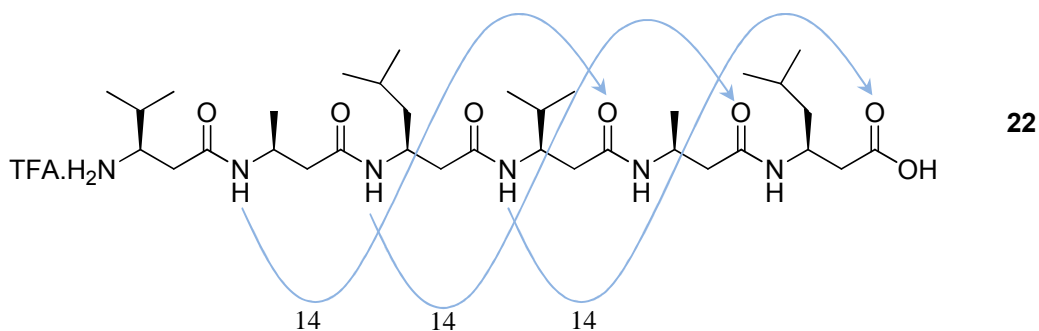


Figure 26 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice H-14

Les études par RMN dans la pyridine- d_5 et par dichroïsme circulaire, corroborées par une étude par modélisation moléculaire ont permis aux auteurs de montrer que cet oligomère, formé de six résidus β -aminoacide, se structurait en hélice H-14. La même structuration a été observée à l'état solide.

Le groupe de Gellman a étudié des oligomères de β -aminoacides rigidifiés de type alicycliques.⁶⁰

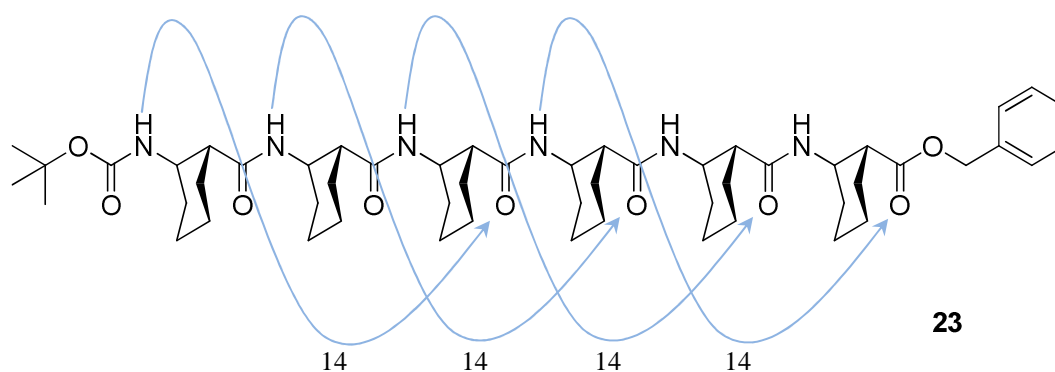


Figure 27 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice H-14

Ainsi, ils ont pu mettre en évidence sur un hexamère du *trans*-ACHC (acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique) que la présence de β -aminoacides contraints engendrait une forte stabilisation de l'hélice H-14 formée. Les angles imposés à la structure par les β -aminoacides constitutifs en seraient la principale cause, du fait du blocage de la conformation synclinale.

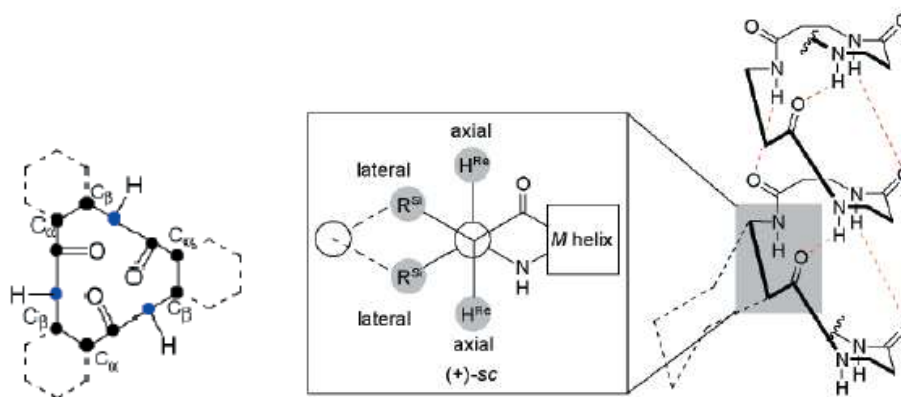


Figure 28 – Structuration en hélice H-14 d'un hexamère du *trans*-ACHC

– Hélice-12

La structure de l'hélice H-12 est stabilisée par une série de liaison hydrogène entre le proton NH_i de l'amide d'un résidu i avec le carbonyle CO_{i-3} d'un résidu $i-3$.

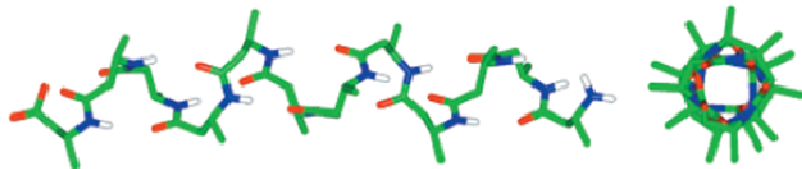


Figure 29 – Hélice H-12

La structuration en hélice H-12 a été mise en évidence pour la première fois par Gellman.⁶⁹ Au cours d'études par modélisation moléculaire destinées à comparer les oligomères du *trans*-ACHC (cyclohexyl) et du *trans*-ACPC (cyclopentyl), Gellman et coll. ont mis en évidence qu'un hexamère du *trans*-ACPC, ne se repliait pas en hélice H-14 mais en une hélice H-12 conformationnellement plus favorable. Des études expérimentales sont ensuite venues confirmer ces prédictions, à l'état solide et en solution. Les auteurs ont également étudié et comparé les repliements de β -peptides du *trans*-ACPC et de la *trans*-APC (acide *trans*-3-amino-pyrrolidine-4-carboxylique), cette dernière étant un β -aminoacide hétérocyclique à cinq chaînons incluant un hétéroatome. Dans les deux cas, la conformation en hélice H-12 a été la plus favorable.

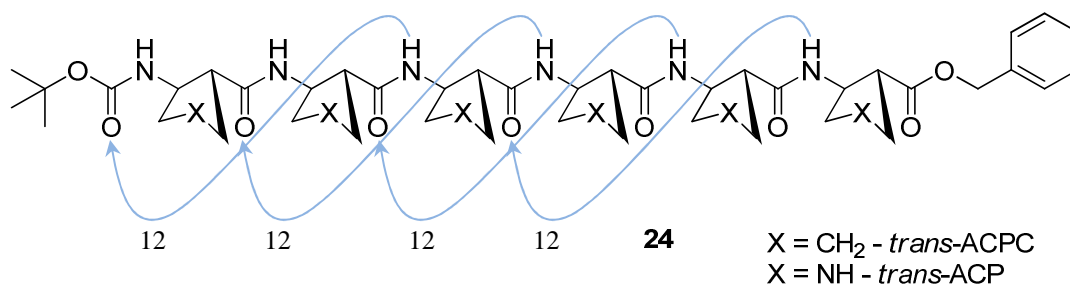


Figure 30 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice H-12

– Hélice-10

L'hélice H-10 est stabilisée par un ensemble de liaisons hydrogène entre le proton NH_i de l'amide d'un résidu i avec le carbonyle CO_{i+1} d'un résidu $i+1$, pour donner des boucles incluant 10 atomes.

Ce type de repliement a été observé par Fleet et coll.⁷⁰ lors de leurs études d'un hexa- β -peptide dérivant de l'acide *cis*-3-amino-oxétane-2-carboxylique, un β -aminoacide de type

oxétane, de configuration *cis*, contrairement aux résidus tels que le cyclohexane-, cyclopentane- ou pyrrolidine- discutés précédemment dont la configuration relative était *trans*.

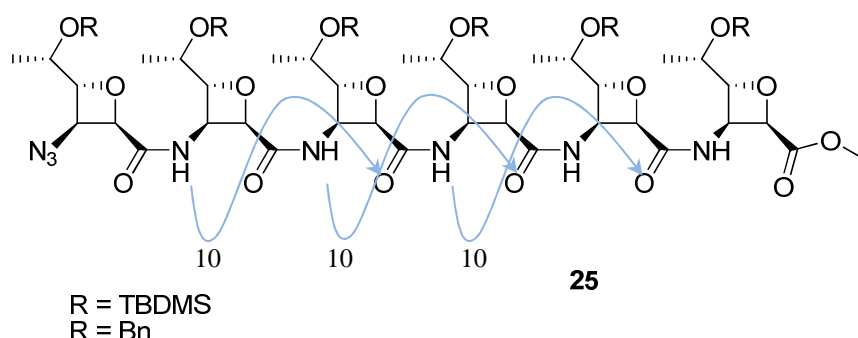


Figure 31 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice H-10

S'appuyant sur les travaux de Gellman, Fülöp et *al.*⁷¹ ont montré que des tétramères de (*R,R*) et (*S,S*) *trans*-ACHC se repliaient en hélice de type hélice H-10. Cette découverte présente un intérêt non négligeable dans le sens où il s'agit ici d'un tétramère. Ceci montre bien l'influence de l'introduction de β -aminoacides rigidifiés sur les propriétés de structuration des oligomères dans lesquels ils sont inclus.

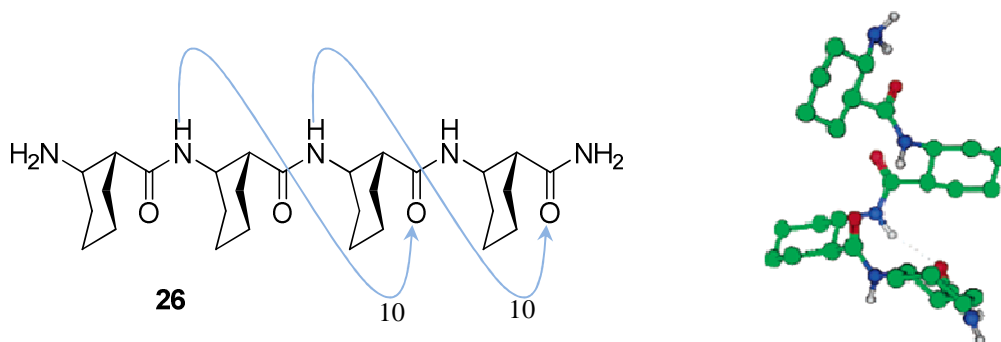


Figure 32 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice H-10

– Hélice 10/12

Ce type de repliement a été observé sur des oligomères mixtes alternant β^2 - et β^3 -aminoacides. Sachant que les β^3 - et les β^2 -aminoacides induisent des repliements des oligomères qui en sont constitués en hélice H-14, on aurait pu penser qu'un peptide dont le squelette alternerait ces deux types de β -aminoacides adopterait le même type de structuration. Les études menées par Seebach^{42,65} ont montré un comportement tout à fait singulier de ce type d'oligomères, à savoir qu'ils forment une hélice H-10/12 d'hélicité droite,

constituée d'une alternance de boucles à 10 et 12 atomes stabilisées par des liaisons hydrogène.

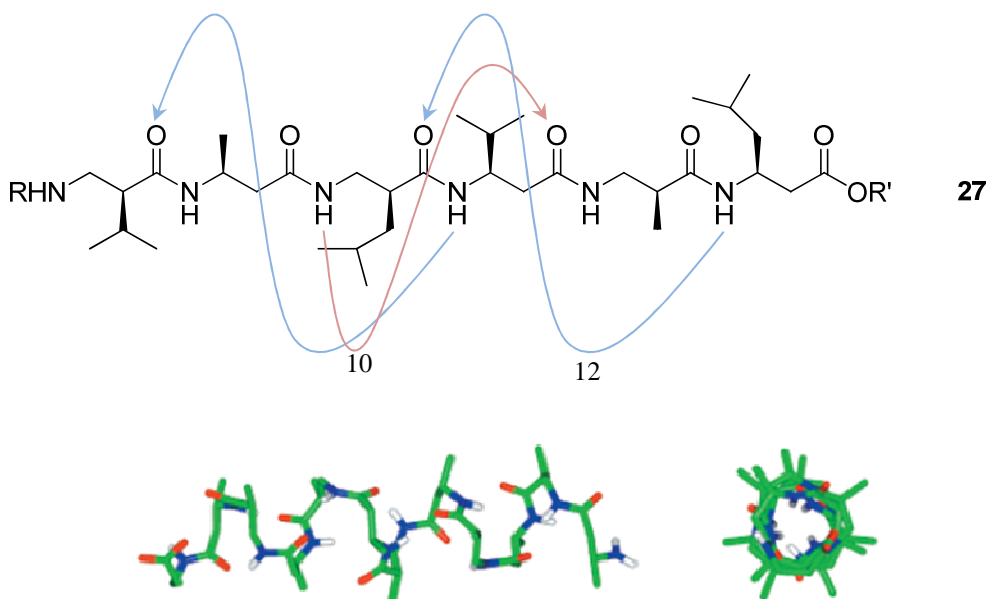


Figure 33 – Hélice H-10/12 et liaisons hydrogène impliquées

Dans le cas de l'hexamère présenté sur la Figure 33, cette hélice consiste en une boucle centrale à 10 chaînons encadrée par deux boucles à 12 chaînons. Les liaisons hydrogène pointant alternativement vers le haut et vers le bas de l'axe de l'hélice, le moment dipolaire résultant est nul.

– Hélice-8

Le repliement en hélice H-8 est obtenu par formation de liaisons hydrogène stabilisantes entre le proton NH_i de l'amide d'un résidu i avec le carbonyle CO_{i-2} d'un résidu $i-2$, pour donner des boucles incluant 8 atomes.

Tout comme l'hélice H-10, l'hélice H-8 n'a, à ce jour, jamais été observée sur des β -peptides composés d'acides aminés protéinogéniques homologués. La littérature rapporte deux exemples de structures adoptant une structuration en hélice-8.

Seebach⁵² a présenté un β -peptide constitué de motifs d'acide 1-(aminométhyl)cyclopropanecarboxylique. Il s'est avéré que ce composé avait une tendance à se replier et à former des boucles incluant 8 atomes.

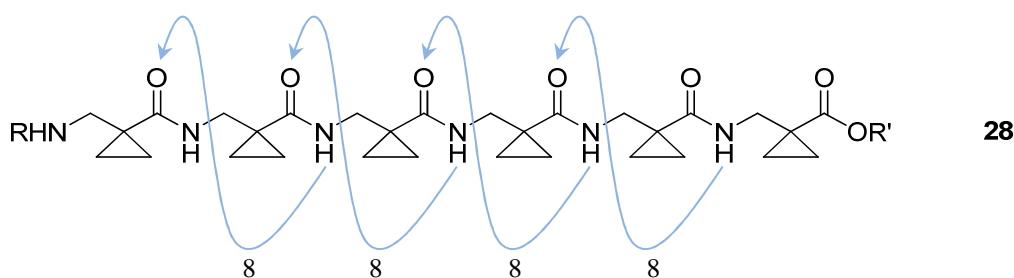


Figure 34 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice H-8

On peut également citer comme exemple les travaux de Klein et coll.⁷² qui ont détecté la formation d'une hélice H-8 sur des oligomères originaux dérivés d'oxanorbornène.

D'autres exemples sont rapportés dans la littérature, comme par exemple d'oligomères constitués d'unités β^3 -aza⁷³ et β^3 -oxa-aminoacides.⁷⁴ Ces β -aminoacides ont la particularité de présenter un hétéroatome en position β - et se structurent en hélice H-8.



Figure 35 – Structures des β^3 -aza et β^3 -oxa-aminoacides

– Hélices chimériques

Gellman⁷⁵ a mis en évidence le fait que les oligomères mixtes de β - et α -aminoacides montraient une tendance à se replier en hélices alternées. Ce comportement est à rapprocher de celui observé pour des oligomères mixtes β^2 -/ β^3 -. Il a donc décrit l'existence d'une hélice « chimérique » 11/11/12 pour un hexamère :

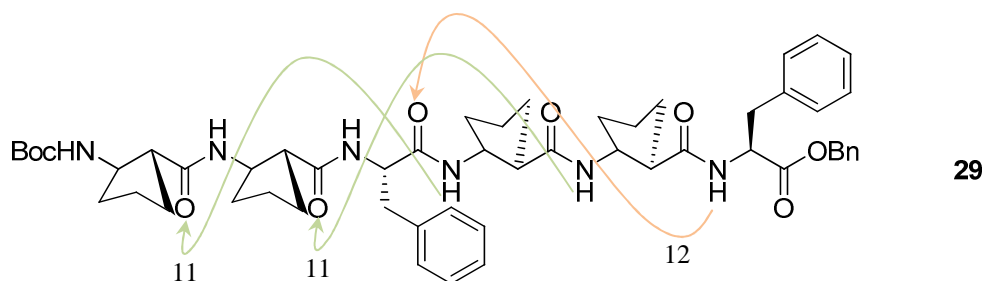


Figure 36 – Liaisons hydrogène impliquées dans une hélice chimérique H-11/11/12

ii- Les feuillets et les coudes

Ce type de structuration est observé pour un oligomère quand la formation d'une hélice est défavorisée, notamment du fait de la conformation des β -aminoacides constitutifs. Ainsi, les $\beta^{2,3}$ -aminoacides de configuration *anti* engendrent des oligomères qui se structureront en feuillet plutôt qu'en hélice. Un oligomère pour lequel chaque résidu présente un angle de torsion C^2-C^3 antipériplanaire pourra se structurer en feuillet où tous les groupes carbonyles d'amide du squelette seront orientés approximativement dans la même direction et tous les NH d'amide seront orientés dans la direction opposée.

Un feuillet est formé par l'assemblage de plusieurs chaînes β -peptidiques issu de l'établissement de liaisons hydrogène entre les NH d'amide d'une chaîne et les groupes carbonyle d'une autre chaîne comme le montre la Figure 37.

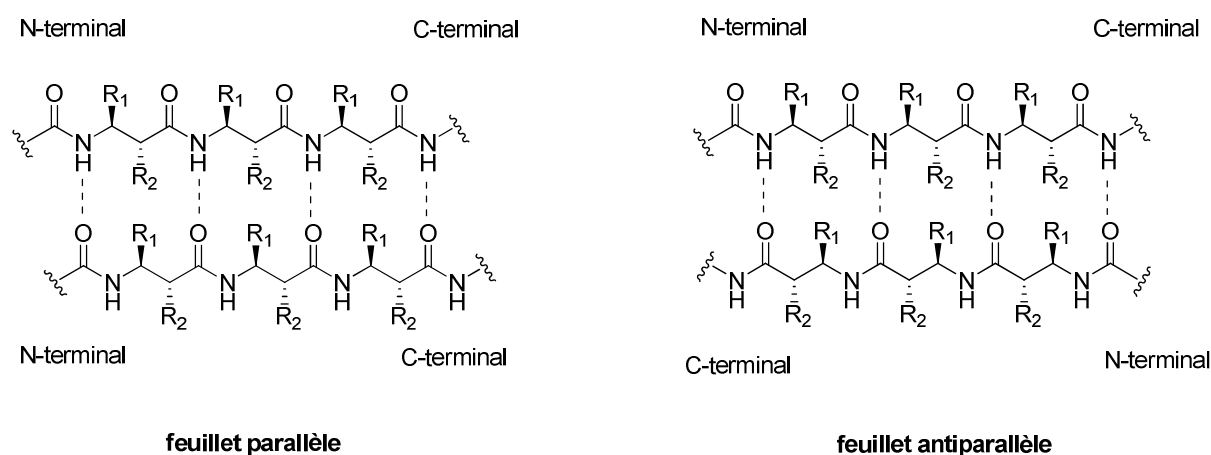


Figure 37 – Les deux types de structuration en feuillets

On pourra alors observer deux types de feuillets, parallèle ou antiparallèle, selon la direction prise par chaque squelette peptidique. On peut citer en exemple les travaux de Seebach *et al.*⁷⁶ qui ont montré un empilement en feuillet de trimères constitués de trois $\beta^{2,3}$ -aminoacides présenté sur la Figure 38.

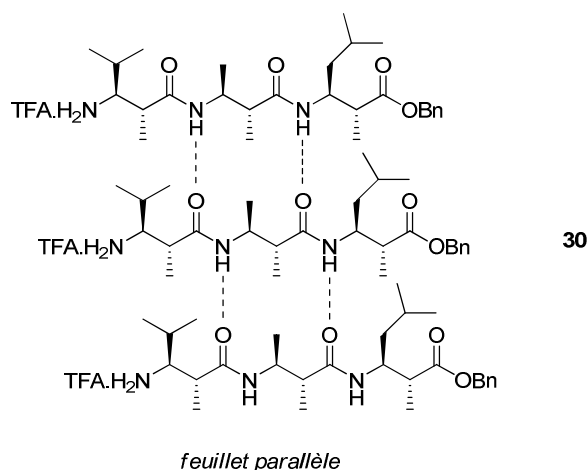


Figure 38 – Exemple de structuration d’un trimère en feuillet

La structuration en coude peut induire une structuration en feuillet. En effet, un coude est obtenu par le repliement d’une chaîne peptidique pour donner un empilement de type feuillet antiparallèle. Le coude peut être naturellement issu d’une torsion au niveau d’une fonction amide⁷⁶ ou il peut être artificiellement induit par l’introduction d’une fonction adéquate comme un amide tertiaire rigidifié par un acide aminé hétéro- ou alicyclique⁷⁷ (Figure 39).

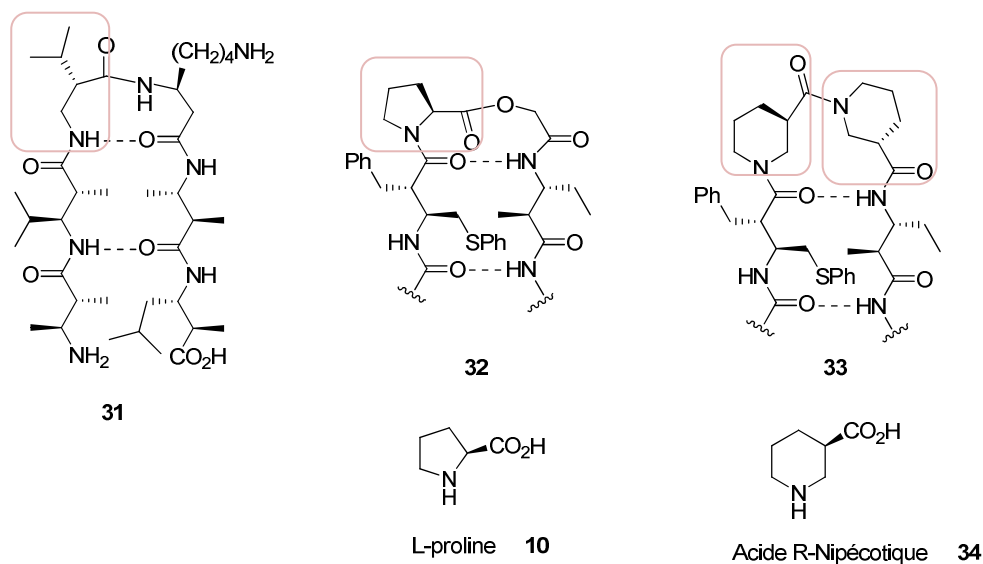


Figure 39 – Exemples de structuration en coudes

B- Objectifs

Introduction

La finalité des travaux de l'équipe est de construire des édifices correctement apprêtés capables d'induire une réponse immunitaire efficace. Notre choix, s'est porté sur des plateformes β -peptidiques. Les β -peptides présentent des avantages en termes de stabilité et leur utilisation permet de conserver le caractère peptidique de la chaîne qui doit présenter les différents épitopes, notamment saccharidiques et peptidiques.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis essentiellement attachée à construire des assemblages β -peptides-épitope Tn. Ces assemblages constituent le cœur d'édifices plus complexes visés dans l'équipe et qui résulteront de la conjugaison avec un peptide épitope T-helper ou bien encore avec l'immunoadjuvant Pam₃-Cys-OH. La conjugaison avec un fluorochrome pour étudier le ciblage des cellules dendritiques est également prévue.

Parallèlement à l'élaboration de β -peptides glycoconjugués pour l'immunothérapie anti-cancer, le second objectif qui m'a été assigné est l'étude de la structuration secondaire des oligomères obtenus.

Pour les deux parties du projet, nous avons utilisé de courts oligomères de β -peptides comme structure de base. Pour ce qui est de la synthèse des édifices glycoconjugués destinés aux tests biologiques, nous avons restreint nos travaux à l'étude de trimères. En effet, la littérature rapporte des exemples de vaccins anticancer de type trimérique. L'équipe du Professeur Leclerc (Institut Pasteur, Paris), avec qui nous avons débuté une collaboration sur cette partie du sujet, a notamment obtenu des résultats très encourageants sur des vaccins trimériques. La partie « Analyse conformationnelle » du projet a porté sur l'étude d'oligomères ayant jusqu'à six résidus.

I- Immunothérapie anticancéreuse

L'élaboration de vaccins induisant une réponse immunitaire antitumorale à visée thérapeutique est un challenge de longue date. La mise en évidence de dérèglements de certains processus de transformations cellulaires au niveau des cellules cancéreuses mais surtout la compréhension croissante de ces phénomènes ont abouti ces dernières années à l'élaboration de vaccins anticancers de plus en plus prometteurs. L'identification de nombreux antigènes associés aux tumeurs (TACAs) a permis leur utilisation dans la composition de vaccins et leur évaluation biologique et clinique. Certains de ces vaccins sont actuellement en phase de tests cliniques chez l'homme. D'autres approches présentent un

intérêt grandissant et notamment le ciblage des antigènes tumoraux directement sur les cellules présentatrices d'antigènes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail de recherche. Notre but est de synthétiser et d'évaluer le potentiel immunogène de structures bioconjuguées totalement synthétiques. Nous visons deux aspects de la réponse immunitaire. D'une part, les édifices synthétiques permettront l'induction de réponses anticorps. Ce type de réponse passe par l'apprêtement de l'antigène par une cellule présentatrice de l'antigène, ce qui entraîne une activation des lymphocytes T, suivie de la différenciation de lymphocytes B, induisant la production d'anticorps. D'autre part, les vaccins synthétiques permettront l'induction d'une réponse immunitaire à *médiation cellulaire*, en ciblant les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (APC), telles que les cellules dendritiques (CD). Ces cellules, les plus efficaces des APC, sont présentes dans les organes lymphoïdes mais également au niveau de la peau et des muqueuses où elles jouent un rôle de sentinelle. Les CD sont connues pour leur aptitude à internaliser les antigènes par phagocytose, par macropinocytose et par endocytose faisant intervenir des récepteurs.^{78,79} Les cellules dendritiques présentent à leur surface différents récepteurs de l'immunité innée et notamment des récepteurs de type lectine (C-type lectin receptors CLR) ; les lectines sont des protéines pouvant se lier aux carbohydrates. Les CLR sont des récepteurs impliqués notamment dans la reconnaissance de l'antigène, son internalisation dans la cellule dendritique et sa présentation. Ils interviennent également dans les processus de signalisation. Ceci entraîne l'activation des cellules T_H et déclenche ainsi l'induction de réponses immunitaires adaptatives, humorale et/ou cellulaire. Les CLR prennent part non seulement au processus de reconnaissance de motifs moléculaires associés à un pathogène (PAMP – *pathogen-associated molecular pattern*), tels que les antigènes glycosylés, mais aussi à la reconnaissance de ligands endogènes associés aux processus d'interactions cellule-cellule au cours de la réponse immunitaire. Ils peuvent par ailleurs se lier à des antigènes solubles du Soi et gérer ainsi le phénomène de tolérance immunitaire.⁸⁰ Les CLR peuvent être effectifs seuls ou en collaboration avec d'autres récepteurs tels que les récepteurs Toll (TLR – *Toll-like receptors*). De nombreux CLR ont été identifiés. Par exemple, le MR (Mannose receptor) et le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin) sont des récepteurs présentant une grande affinité pour les antigènes mannosylés. Des études ont montré que des protéines mannosylées pouvaient déclencher une réponse immunitaire,⁸¹ du fait de leur capacité à cibler les récepteurs MR.⁸² L'élaboration de structures totalement synthétiques, chimiquement bien définies, combinant des ligands de type carbohydrate permettant la reconnaissance par un CLR et des épitopes peptidiques spécifiques des cellules T, présente un grand intérêt pour

l'élaboration d'un vaccin antitumoral passant par un ciblage des CD. Les processus de reconnaissance par les récepteurs de mannose ont été assez largement étudiés.⁸³ Ces études laissent ainsi à penser que les CRLs seraient impliqués dans la reconnaissance d'antigènes associés aux tumeurs (TACAs). Récemment, il a été montré que le CLR DC-SIGN pouvait reconnaître des épitopes glycaniques spécifiques sur l'antigène CEA (carcinoma embryonic antigen) dans des cancers du colon.⁸⁴ Par ailleurs, il a été montré que les antigènes présents sur des cellules nécrotiques pouvaient, dans certains cas, induire une réponse immunitaire.⁸⁵ Les travaux récents de Reis e Sousa⁸⁶ ont montré que la perte ou le blocage d'un CLR, le CLEC9A (ou DNGR-1), réduisait significativement la présentation par les cellules dendritiques d'antigènes associés aux cellules nécrotiques, réduisant ainsi l'immunogénicité de ces dernières. Ce récepteur crée un lien entre la perception de la nécrose cellulaire et le principal sous-ensemble des cellules dendritiques impliquées dans la stimulation des cellules T cytotoxiques CD8+.

Les études portant sur la reconnaissance de galactose ou de GalNAc par les CD sont peu nombreuses. Il a cependant été démontré qu'il existe un CLR, le récepteur MGL (macrophage galactose-type C-type lectin) capable de se lier au galactose et au *N*-acétylgalactosamine GalNAc sous forme de monosaccharides.⁷⁹ Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire de type II qui possède un unique domaine extracellulaire de reconnaissance des carbohydrates. Il est exprimé sur les CD immatures chez l'homme, la souris et le rat,⁸⁷ ainsi que sur les macrophages dans la peau et les ganglions lymphatiques.⁸⁸ Il peut reconnaître des sucres présentant des résidus Gal/GalNAc terminaux et particulièrement des clusters de chaînes tronquées de carbohydrates *O*-glycosylés tels que les antigènes TF et Tn des mucines.⁸⁹ Par ailleurs, il a été montré que des glycopeptides de type Tn-MUC1 sont internalisés via les MGL et qu'ils sont délivrés dans les endosomes des CD qui sont les compartiments où les antigènes sont apprêtés et couplés aux molécules de classe II du CMH.⁹⁰ On comprend ainsi toute l'importance que revêt l'élaboration d'un vaccin permettant de cibler ces récepteurs MGL afin d'initier la réponse immunitaire de manière efficace.

1- Structure des vaccins

Les objectifs du projet consistent en la synthèse et l'évaluation biologique d'édifices totalement synthétiques, chimiquement définis qui présenteront plusieurs blocs différents greffés sur une plateforme centrale. La nature de ces blocs variera en fonction de l'objectif visé.

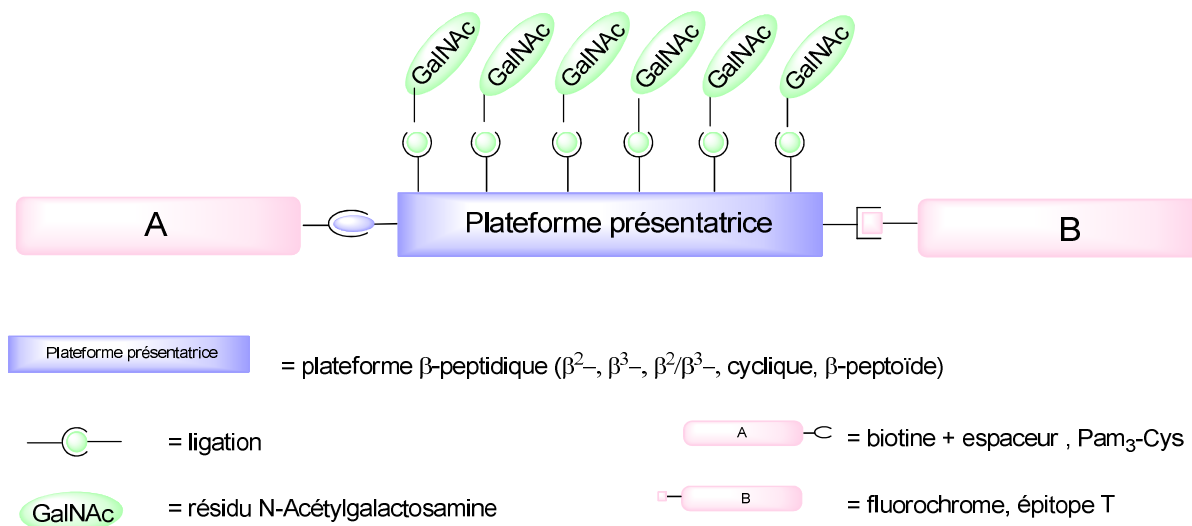


Figure 40 – Structure générique des vaccins synthétiques envisagés

Les édifices seront construits séquentiellement (Figure 40). La plateforme présentatrice, obtenue par synthèse chimique, sera greffée avec les unités saccharidiques. L'ensemble sera ensuite couplé avec les blocs A et B, dont la nature dépendra des tests biologiques envisagés.

a- Plateforme présentatrice multivalente de type β -peptidique

Les CLR s présentent un domaine de reconnaissance des sucres avec un ou plusieurs sites de liaison. Ainsi, la liaison se fera préférentiellement avec des sucres présentés sous forme de clusters plutôt que sous forme monomérique.

Nous avons choisi de cibler de manière plus particulière les MGLs. C'est pourquoi la plateforme présentatrice sera construite de façon à présenter des copies multiples de résidus GalNAc. Les interactions entre les unités saccharidiques et les lectines dépendront non seulement de la densité de ligands saccharidiques sur la plateforme mais aussi du type de plateforme et de ses propriétés géométriques. De plus, l'effet « cluster », évoqué précédemment, entre aussi en ligne de compte dans les phénomènes de reconnaissance entre

le TACA GalNAc et les anticorps anti-GalNAc pour l'induction d'une réponse immunitaire humorale. La présence de trois résidus GalNAc-Ser/Thr consécutifs est essentielle pour mimer le caractère épitopique des MUC1 tumorales. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de mettre en évidence l'importance de la présentation des épitopes Tn sous forme de clusters. Ceci a été montré, par exemple, sur des glycopeptides issus de la digestion de Glycophorine A par une glycoprotéase.⁹¹ Après traitement de ces fragments par une sialidase et une β -galactosidase, les auteurs ont montré que seuls les fragments présentant trois ou quatre résidus GalNAc-Ser/Thr consécutifs pouvaient se lier à l'anticorps monoclonal MS 128.

Nous avons choisi de travailler avec des plateformes de type β -peptidiques. Leur grande stabilité vis-à-vis des processus de dégradation métaboliques et protéolytiques en fait des structures de choix pour des applications biologiques. Les chaînes β -peptidiques seront obtenues selon une approche la plus convergente possible.

Nous incluons également dans nos travaux des plateformes de type β -peptoïde. Les β -peptoïdes sont des analogues de β -peptides sur lesquels les substituants latéraux ne sont pas portés par les atomes de carbones du squelette mais par l'atome d'azote du lien amide.

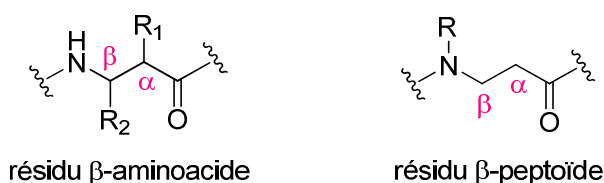


Figure 41 – Différences structurales entre β -aminoacide et résidu β -peptoïde

Les β -peptoïdes sont des pseudopeptides, décrits pour la première fois en 1998.⁹² Tout comme les β -peptides, ils sont peu sensibles aux processus de dégradation biologique (protéases, peptidases) et possèdent une grande biodisponibilité, notamment du fait de leur plus grande facilité à traverser les membranes. Ils sont faciles à synthétiser, ne présentent pas de centre chiral sur le squelette mais permettent d'induire une grande variété au niveau des chaînes latérales. D'autre part, ils ne sont pas intrinsèquement immunogènes⁹³ ce qui présente un grand intérêt pour l'élaboration de vaccins antitumoraux.

De façon générale, les β -peptoïdes sont des structures très flexibles du fait de l'absence de liaisons hydrogène, due à la présence de lien amide tertiaire. De plus ils peuvent se présenter sous la forme d'isomère *cis* ou *trans* au niveau des liens amide. Les β -peptides et β -peptoïdes ont donc des comportements très différents en termes de flexibilité des chaînes et seront donc complémentaires pour notre étude.

b- Introduction des résidus GalNAc par ligation chimique

Les résidus GalNAc seront introduits sur la plateforme de manière simple et simultanée par ligation chimique. Pour cela, des études seront menées sur deux types de ligation : une ligation de type 1,2,3-triazole, obtenue par réaction de cycloaddition catalysée au cuivre entre un alcyne et un azoture (CuAAC – Copper catalysed Alcyne-Azide Cycloaddition – « Click Chemistry ») et par une ligation de type oxime.

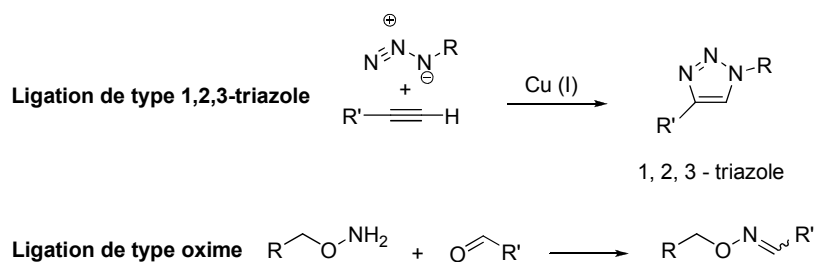


Figure 42 – Types de ligation mises en œuvre

Les avantages de l'utilisation des réactions de CuAAC seront développés ultérieurement.

En ce qui concerne les réactions de formation d'oxime, elles sont d'une part faciles à mettre en œuvre et efficaces et d'autre part, elles sont hautement sélectives.⁹⁴ L'avantage de ce type de ligation est sa grande stabilité sur une gamme relativement étendue de pH aux alentours du pH physiologique.⁹⁵ De plus, il a été montré qu'une ligation de type oxime pouvait être parfaitement en adéquation avec l'observation d'une réponse immunitaire, humorale et à médiation cellulaire.⁹⁶

Les synthèses des plateformes et des sucres seront ainsi adaptées au type de ligation envisagée.

c- Structure des différents édifices synthétisés

Comme évoqué précédemment, les objectifs visés à plus ou moins long terme consistent en la synthèse de structures glycoconjuguées qui permettraient d'induire des réponses spécifiques de cellules tumorales, et donc une vaccination thérapeutique permettant l'élimination de ces cellules. Dans ce cas, la plateforme sur laquelle les unités saccharidiques auront été greffées sera couplée à un immunoadjuvant (*Bloc A*). En effet, la partie

saccharidique est responsable du ciblage des cellules dendritiques, mais l'induction de réponses immunitaires optimales dépend de la maturation des cellules dendritiques qui est induite par des adjuvants tels que des ligands des TLR. Notre choix s'est porté sur le Tripalmitoyl-S-glycérilcystéine (Pam₃-Cys) qui possède des propriétés adjuvantes. Le Pam₃-Cys est un lipide synthétique dérivant de la partie *N*-terminale de lipopeptides bactériens.⁹⁷ Il est connu pour être un activateur des cellules B et des macrophages. Par ailleurs, il a été montré qu'il induisait la maturation des cellules dendritiques par l'intermédiaire du récepteur TLR2,⁹⁸ participant ainsi à part entière à la réponse immunitaire. L'ensemble obtenu pourra également être couplé à un épitope spécifique des cellules T (*Bloc B*), reconnu par le TCR en association avec les molécules du CMH. Dans notre cas, nous nous intéressons plus particulièrement à la réponse immunitaire de type CD4, impliquant les cellules T et la présentation des antigènes par les molécules de classe II du CMH. En effet, la branche du système immunitaire mettant en jeu les cellules T helper CD4 joue un rôle important en termes de défense mais surtout de mémoire immunitaire. Des essais cliniques ont montré l'importance de cette voie du système immunitaire pour la production de cellules Th spécifiques des tumeurs et de CTL, devant permettre la génération d'une réponse immunitaire de longue durée.⁹⁹ La plupart des vaccins anticancers présentent une activité à trop court terme, visant plutôt à prévenir des cas de rechutes après des traitements chirurgicaux ou de chimiothérapie. La mise à profit de cette voie pourrait permettre l'élaboration de réels vaccins générant une réponse immunitaire de longue durée.

Mes travaux de recherche ont essentiellement porté sur la synthèse de structures devant servir d'« outils » préliminaires à la synthèse de molécules ayant une application en vaccination anti-cancer. Le premier type d'outil, destiné à évaluer l'antigénicité par l'étude de la reconnaissance par des anticorps spécifiques de Tn, sera constitué de trimères glycoconjugués couplés uniquement à de la biotine par l'intermédiaire d'un bras espaceur (*Bloc A*). En ce qui concerne le ciblage des cellules dendritiques, deux types de structures seront à terme synthétisées. Dans un premier temps, les édifices glycoconjugués seront couplés à un fluorochrome (*Bloc A*), ce qui permettra de mettre en évidence leur capture et leur internalisation par les cellules dendritiques. Par la suite, l'immunoadjuvant Pam₃-Cys (*Bloc B*) sera ajouté à cet ensemble édifice glycoconjugué – fluorochrome.

2- Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse est résumée sur la Figure 43.

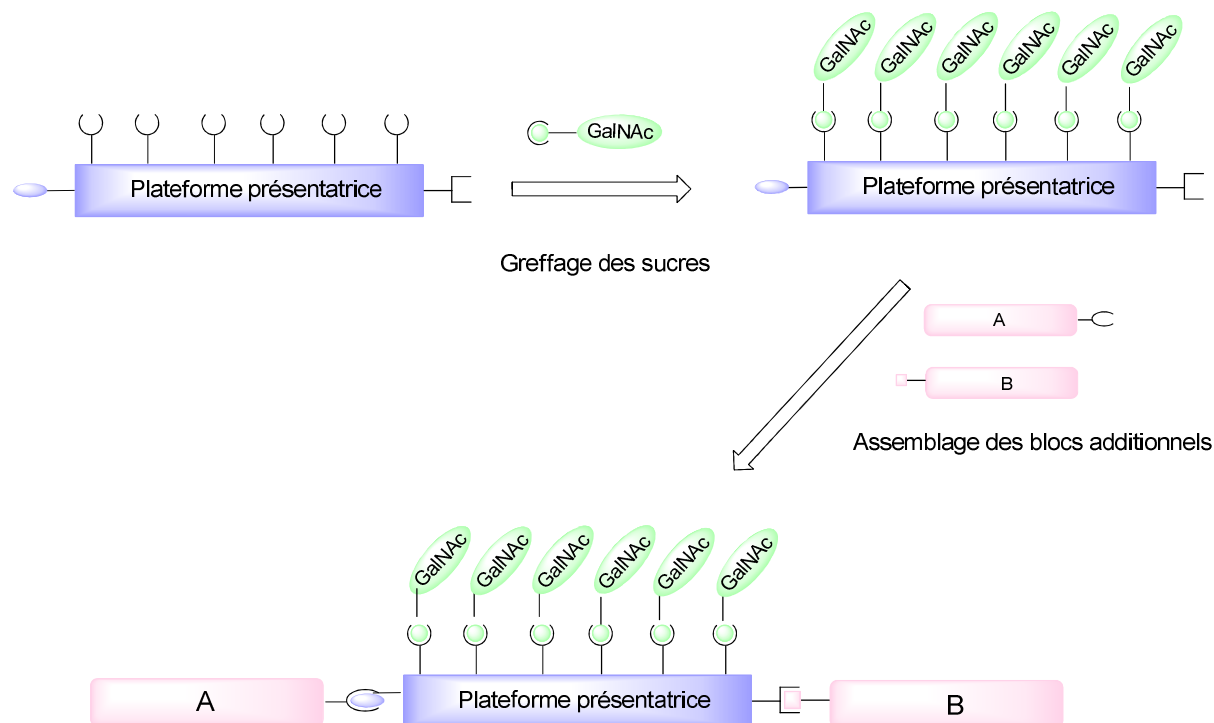


Figure 43 – Voie de synthèse envisagée pour l'obtention des vaccins synthétiques

II- Analyse conformationnelle

Les plateformes β -peptidiques synthétisées ainsi que les composés glycoconjugués qui en découlent seront étudiés d'un point de vue différent. En effet, au-delà de leurs propriétés biologiques, les β -peptides montrent de manière assez systématique une forte tendance à adopter des structurations secondaires en hélice, feuillet ou coude.

Dans cette partie du projet, nous nous sommes donc consacrés à l'étude des oligomères β -peptidiques constituant les plateformes présentatrices afin de déterminer la présence ou l'absence de repliement en structure particulière. Cette étude mettra en œuvre différentes techniques d'analyses spectroscopiques, notamment la RMN (1D et 2D), le dichroïsme circulaire et l'infrarouge en solution. La confrontation des observations effectuées à l'issue de ces différentes analyses devrait nous permettre de statuer sur la nature d'une éventuelle structuration secondaire.

Par ailleurs, il nous a semblé particulièrement intéressant de nous pencher sur les structures glycoconjuguées dérivées des oligomères afin d'étudier l'influence de l'introduction des unités saccharidiques sur les plateformes d'un point de vue structural. Les résultats des analyses seront comparés à ceux obtenus pour les oligomères seuls.

**C- Résultats
& Discussion :
Synthèse**

I- Synthèse des oligomères β -peptidiques

Les objectifs visés dans cette partie sont l'obtention d'oligomères β -peptidiques qui serviront de plateformes présentatrices des épitopes saccharidiques et en vue de l'étude de leur préférence conformationnelle. Nous aurons recours à deux méthodes différentes de ligation chimique pour ancrer les sucres sur les plateformes, à savoir : 1,2,3-triazole et oxime, d'où découleront les fonctions chimiques devant être présentes sur les plateformes.

1- Essai de synthèse itérative de β -peptides sans agents de couplage

a- Rappels bibliographiques

Au début de notre projet, des travaux récents de J. W. Bode¹⁰⁰ ont attiré notre attention. Cette équipe proposait en effet la synthèse de courts oligomères β^3 -peptides par une voie originale en milieu aqueux et sans agent de couplage.

Cette nouvelle voie de synthèse de liaison amide met en jeu une condensation-décarboxylation d'un α -cétoacide et d'une *N*-alkyhydroxylamine :

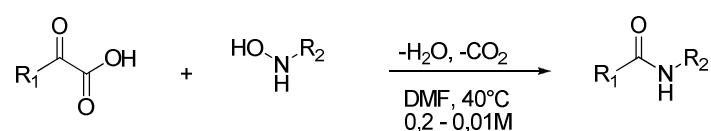


Schéma 3 – Condensation-décarboxylation d'un α -cétoacide et d'une *N*-alkyhydroxylamine

Cette réaction peut être menée dans des solvants polaires protiques ainsi que dans des solvants apolaires. Aucun catalyseur ou réactif de couplage ne sont nécessaires et les seuls sous-produits de la réaction sont de l'eau et du dioxyde de carbone. Ces conditions font que cette réaction d'amidation entre dans la classe des réactions chimiosélectives,¹⁰¹ à savoir : conditions de réaction douces, souvent en milieu aqueux, concentrations molaires faibles, pas de réactif ou de catalyseur et pas de sous-produit.

Cette voie de synthèse itérative de β^3 -peptides en solution aqueuse met en jeu un α -cétoester et une isoxazolidine comme forme masquée de β -amino acide (Schéma 4).¹⁰²

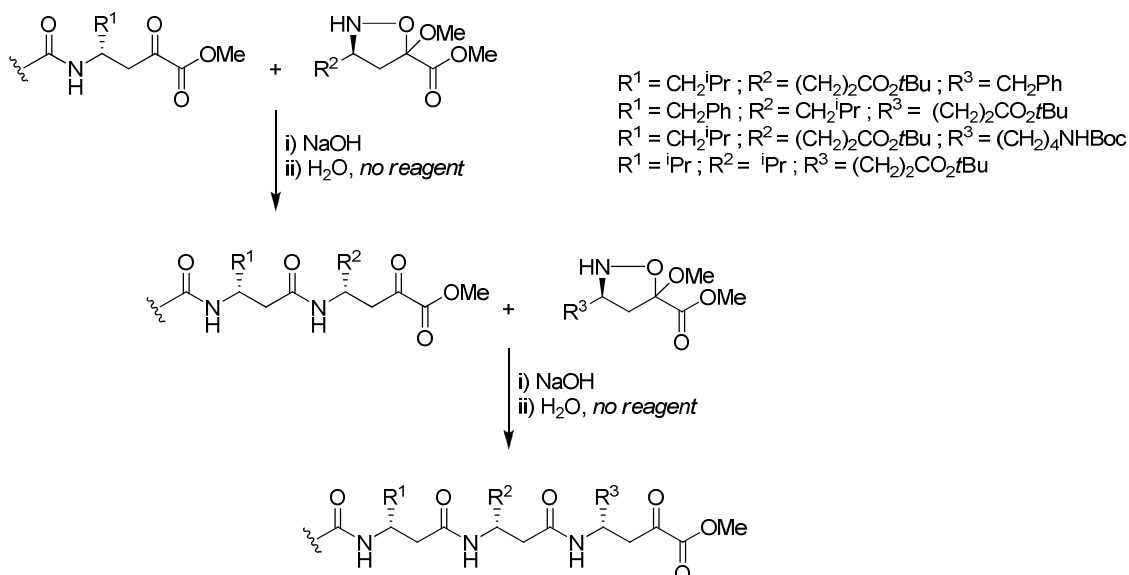


Schéma 4 - Synthèse itérative de β^3 -peptides

Dans cette approche, les isoxazolidines sont obtenues sous forme énantiopure en mettant à profit la réaction de cycloaddition diastéréosélective de Vasella¹⁰³ entre une nitronne en position anomère d'un monosaccharide et un acrylate (Schéma 5).¹⁰⁴ Ce protocole a été appliqué avec du 2-méthoxyacrylate de méthyle. Ces réactions de cycloaddition [3+2] sont hautement régio- et diastéréosélectives et ont lieu par simple chauffage d'un mélange d'hydroxylamine dérivée de D-Mannose (auxiliaire chiral), de 2-méthoxyacrylate de méthyle et d'un aldéhyde en présence d'une quantité catalytique d'oxyde de dibutylétain. Une fois l'isoxazolidine formée, l'auxiliaire chiral saccharidique est éliminé, soit par traitement acide, soit en présence d'hydroxylamine, pour fournir l'isoxazolidine. Cette dernière est partiellement épimérisée au niveau de l'acétal.

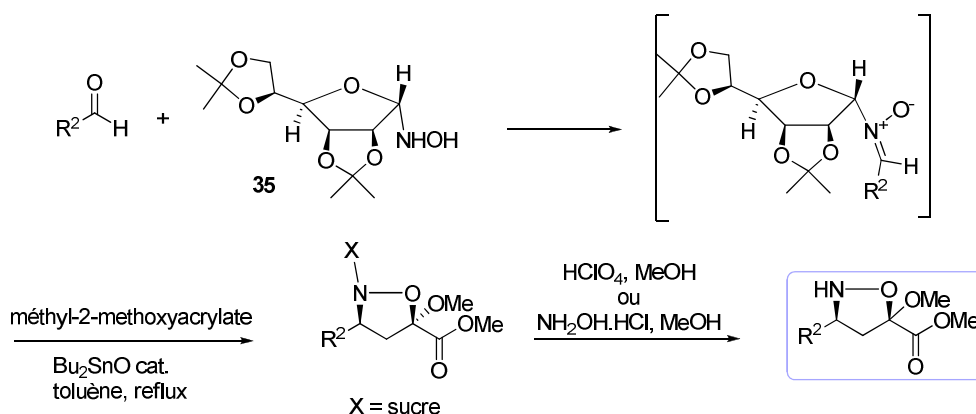


Schéma 5 – Préparation des isoxazolidines

L'isoxazolidine ainsi obtenue réagit aisément avec un α -cétoester selon la procédure de condensation-décarboxylation.

Nous avons donc décidé d'appliquer cette méthodologie à la synthèse des chaînes β^3 -peptidiques qui nous intéressent plus particulièrement.

i- Synthèse des précurseurs

Il s'agit, dans un premier temps, de synthétiser les différents précurseurs nécessaires à la réaction de cycloaddition, à savoir l'auxiliaire chiral, le 2-méthoxyacrylate de méthyle et les aldéhydes correctement fonctionnalisés.

(a) Auxiliaire chiral¹⁰⁵

Il est obtenu à partir de D-Mannose qui réagit en présence d'acétone et de P_2O_5 . Le lactol obtenu est traité par du chlorhydrate de *N*-hydroxylamine et de l'acétate de sodium dans l'éthanol pour donner l'hydroxylamine anomère **35a** avec un rendement de 78%. Ce dérivé de 2,3-5,6-di-*O*-isopropylidène-D-glucofuranose existe en équilibre avec la forme oxime **35b**. Dans notre cas, seule la forme oxime **35b** a été observée sur le spectre RMN 1H dans le DMSO- d_6 .

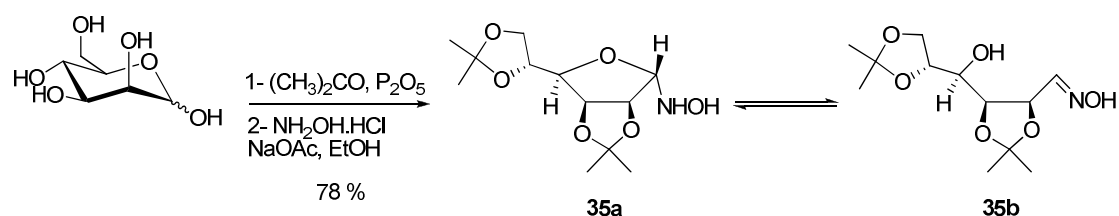


Schéma 6 – Synthèse de l'auxiliaire chiral 35

(b) 2-méthoxyacrylate de méthyle¹⁰⁶

Le 2-méthoxyacrylate de méthyle **37** est obtenu au départ de pyruvate de méthyle (Schéma 7). Ce dernier est traité par du triméthylorthoformate et de l'acide sulfurique concentré dans le méthanol pour donner l' α,α -diméthoxypropionate de méthyle **36** qui est ensuite chauffé en présence d'APTS pour donner après distillation fractionnée le 2-méthoxyacrylate de méthyle **37** avec un rendement de 40% sur deux étapes.

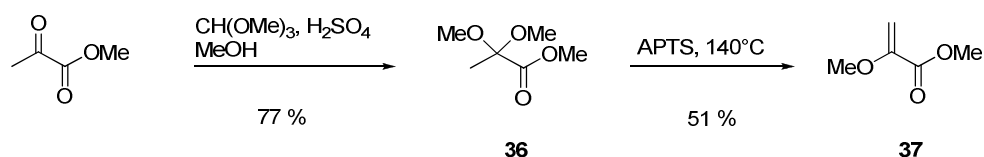


Schéma 7 – Obtention du 2-méthoxyacrylate de méthyle 37

ii- Synthèse des aldéhydes et réactions de cycloaddition [3+2]

La nature des aldéhydes doit être adaptée au type de ligation chimique ultérieurement envisagée pour le greffage des unités saccharidiques sur la plateforme.

(a) Isobutyraldéhyde

Afin de nous familiariser avec ce type de réaction, nous avons commencé par reproduire l'enchaînement réactionnel réalisé par Bode¹⁰² au départ d'isobutyraldéhyde commercial.

L'isobutyraldéhyde commercial fraîchement distillé réagit selon la procédure de cycloaddition [3+2] avec l'hydroxylamine **35** et le 2-méthoxyacrylate de méthyle **37**, en présence de Bu₂SnO (Schéma 8). On obtient l'isoxazolidine glycosylée **38** avec un rendement de 49% (*lit.*¹⁰² : rdt = 48%). L'auxiliaire chiral est éliminé en présence d'acide perchlorique et l'isoxazolidine ainsi déprotégée **39** est couplée avec de l'acide phényl-pyruvique pour donner l'amide **40** avec un rendement de 37% sur les deux dernières étapes (*lit.*¹⁰² : rdt = 45%).

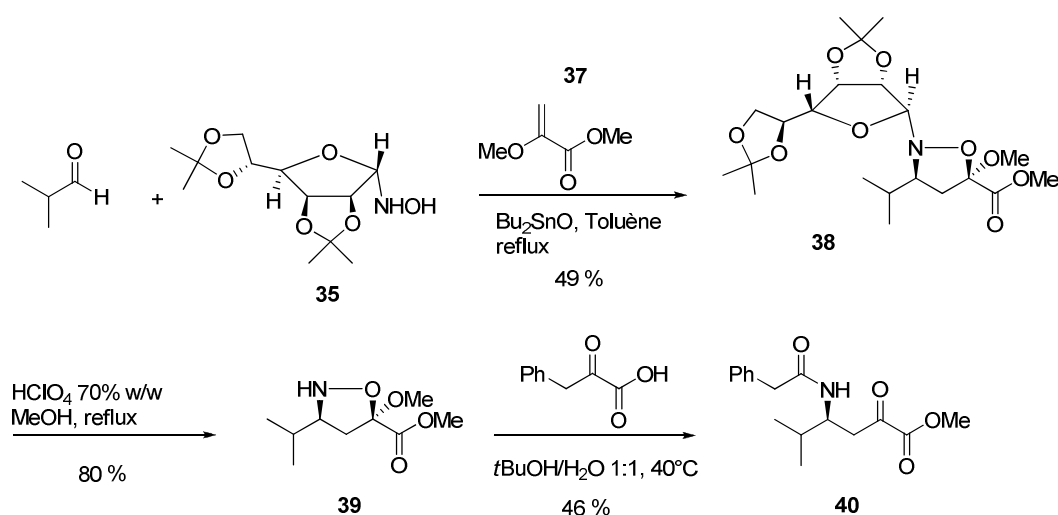


Schéma 8 – Obtention du monomère au départ d'isobutyraldéhyde

La reproduction de cet enchaînement réactionnel s'étant avérée satisfaisante (rendements conformes à ceux de la littérature et puretés satisfaisantes), nous avons décidé de l'appliquer à la synthèse de nos oligomères.

(b) 5-hexyn-1-al

Dans le cas présent, nous nous intéressons à une ligation de type 1,2,3-triazole obtenue par cycloaddition 1,3 dipolaire entre un alcyne et un azoture (CuAAC – *Copper Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*). La plateforme présentera le partenaire alcyne, sous forme d'un motif propargylique.

Nous avons choisi d'appliquer la méthodologie précédente avec le 5-hexyn-1-al **41**¹⁰⁷ qui apporte la fonction alcyne nécessaire pour la réaction de CuAAC. Ce dernier est obtenu par oxydation de Swern¹⁰⁸ avec un rendement de 97 % au départ de 5-hexyn-1-ol.

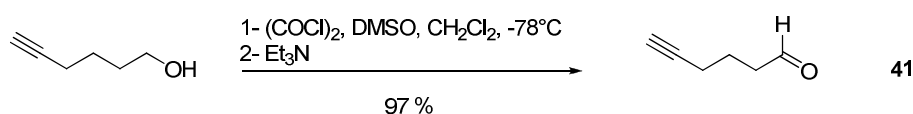


Schéma 9 – Accès au 5-hexyn-1-al **41**

Le spectre RMN ¹H de l'aldéhyde **41** a montré une pureté très satisfaisante : il a donc été engagé dans l'étape suivante sans purification.

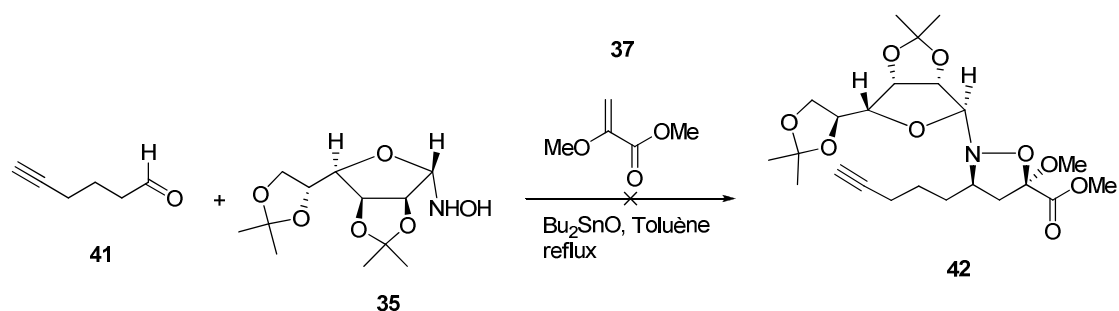


Schéma 10 – Essai de synthèse du composé **42**

Le suivi de la réaction a rapidement montré la présence d'un grand nombre de composés, rendant la purification de ce milieu complexe impossible. La fonction alcyne est manifestement entrée en compétition avec l'acrylate durant la réaction de cycloaddition [3+2] sur la nitroène de façon intermoléculaire.

(c) Dialdéhydes

La réactivité de la fonction alcyne semble donc interdire sa présence sur l'aldéhyde mis en jeu. Nous avons alors décidé d'utiliser des dialdéhydes qui présentent une de leurs fonctions aldéhyde masquée sous forme d'acétal. Cette fonction aldéhyde déprotégée permettra le greffage des sucres antigéniques par une ligature oxime ou 1,2,3-triazole après l'avoir transformée en fonction alcyne (réaction type Corey-Fuchs).

o 4,4-diméthoxybutanal

L'acrylate de méthyle réagit avec du nitrométhane en présence d'HMPT selon une réaction de Michael catalysée au phosphore pour donner le 4-nitrobutyrate de méthyle **43** (Schéma 11)¹⁰⁹ comme produit de monoalkylation.¹¹⁰ Ce dernier est ensuite traité avec de la potasse dans un mélange MeOH/THF selon une réaction de Nef pour donner l'aldéhyde correspondant protégé sous forme d'acétal **44**¹¹¹ par traitement avec de l'acide sulfurique dans le méthanol avec un rendement de 71%.¹¹² La fonction ester méthylique est ensuite réduite en présence de DIBAL-H dans le dichlorométhane à -78°C pour donner le 4,4-diméthoxybutanal **45**¹¹³ avec un rendement brut de 69%.

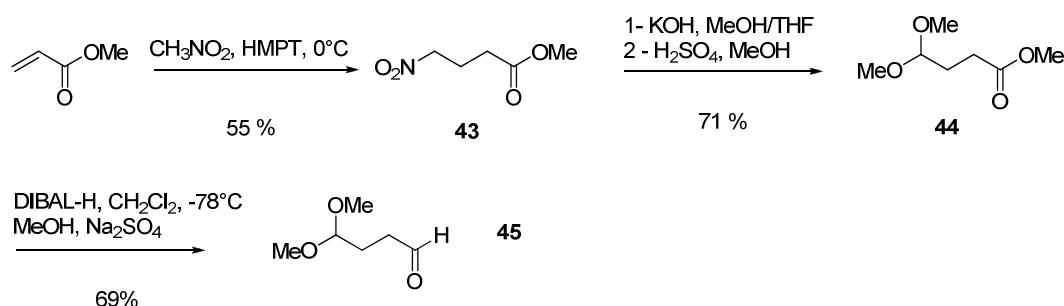


Schéma 11 – Synthèse du 4,4-diméthoxybutanal **45**

L'aldéhyde **45** est utilisé sans purification dans l'étape de formation de l'isoxazolidine malgré une pureté moyenne visualisée sur le spectre RMN.

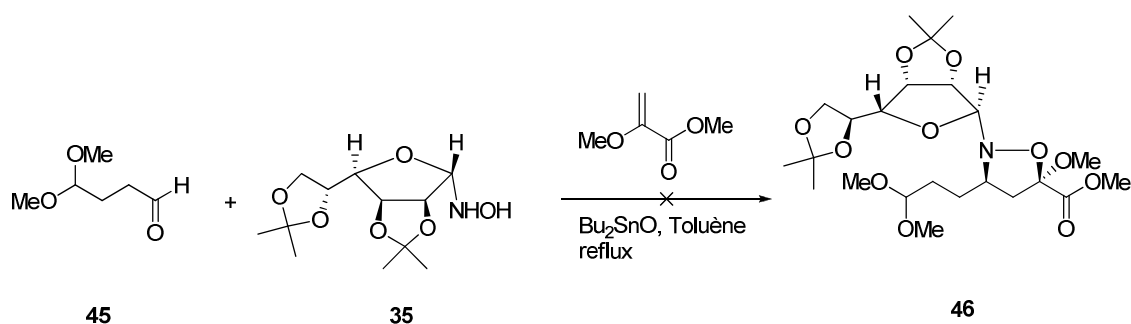


Schéma 12 – Essai de synthèse du composé **46**

De nouveau, la réaction de cycloaddition [3+2] a donné lieu à un mélange complexe, rendant la purification impossible, ceci étant peut-être dû à la pureté de l'aldéhyde **45**.

o 3,3-diéthoxypropanal

Nous avons tenté la formation de l'isoxazolidine avec un autre aldéhyde, le 3,3-diéthoxypropanal, qui est relativement facile d'accès. La première étape consiste en la synthèse de l'alcène précurseur du 3,3-diéthoxypropanal.

Le 4,4-diéthoxybut-1-ène **47** est obtenu avec un rendement de 60% par dimérisation de l'éther vinylique en présence d'acétate mercurique $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ et de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans l'éther¹¹⁴ (Schéma 13). Il est ensuite traité dans des conditions d'ozonolyse réductrice en présence de triphénylphosphine¹¹⁵ pour donner le 3,3-diéthoxypropanal **48** avec un rendement brut de 69%.

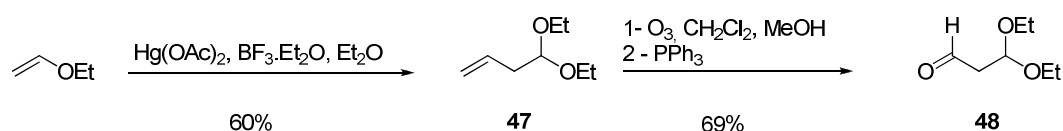


Schéma 13 – Synthèse du 3,3-diéthoxypropanal **48**

La formation de l'isoxazolidine **49** a été observée lors de la réaction de cycloaddition [3+2] (Schéma 14). Cependant, les rendements atteints sont loin d'être satisfaisants. En effet, en présence de Bu_2SnO comme catalyseur, le rendement après purification n'est que de 8%. Nous avons réalisé un essai sans catalyseur afin de juger de son influence lors de la cycloaddition. Le rendement a été nettement amélioré mais reste modeste (36 %).

La coupure entre l'isoxozolidine **49** et l'auxiliaire chiral « sucre » a été tentée en présence d'hydroxylamine. L'utilisation des conditions acides précédemment utilisées n'étant pas applicables ici du fait de la présence des acétals, nous avons dû utiliser les conditions basiques alternatives. Cependant, l'isoxazolidine **50** n'a pas été obtenue à l'issue de cette réaction.

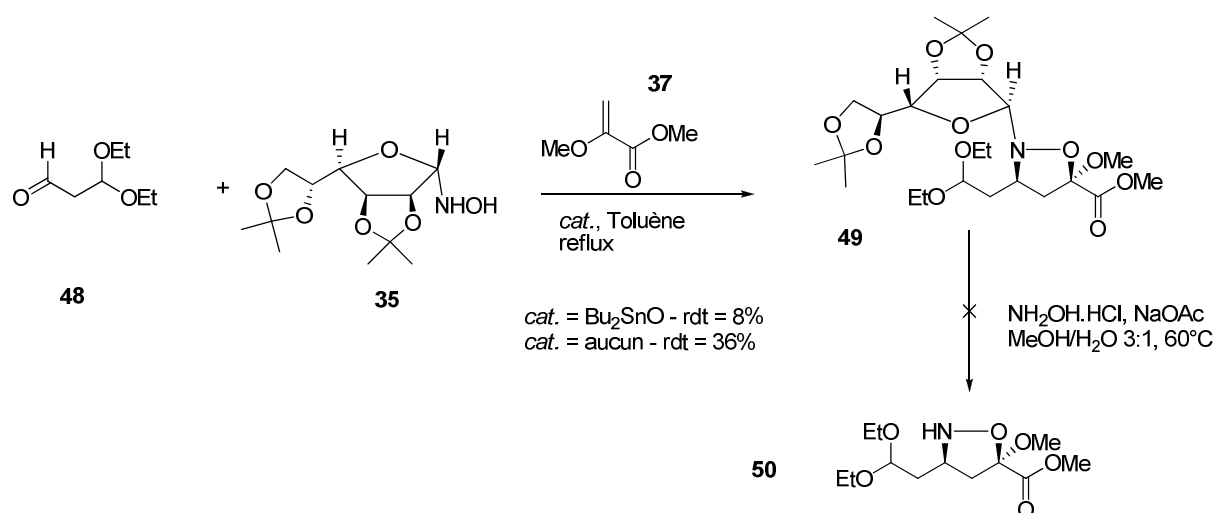


Schéma 14 – Essai d’obtention de l’isoxazolidine 50

iii- Conclusion de l’étude

Nous avons réussi à reproduire la séquence réactionnelle décrite par J. W. Bode¹⁰² au départ d’isobutyraldéhyde. Mais celle-ci n’a pu être étendue aux aldéhydes fonctionnalisés que nous avons choisis. Il faut noter que Bode n’a pas utilisé d’aldéhyde très fonctionnalisé, il s’agissait essentiellement de chaînes alkyles ou d’ester. De ce fait, les rendements moyens annoncés dans cette étude, auxquels s’ajoutent nos essais infructueux (milieux complexes, purifications difficiles, rendements modestes ou faibles) nous ont poussé à abandonner cette approche. Rappelons en effet que nous cherchons une voie d’accès aux oligomères β^3 -peptidiques qui soit facile, rapide et efficace en vue d’obtenir des quantités d’oligomères conséquentes.

2- Synthèse des oligomères par couplage peptidique classique

a- Plateformes de type « propargyl »

❖ Rappels bibliographiques

Nous avons choisi de construire nos plateformes β -peptidiques au départ d’un aminoacide naturel : l’acide (L)-aspartique. En effet, cet α -aminoacide présente une fonction acide carboxylique en position β , ce qui permet de le considérer comme un α - et comme un β -

aminoacide. Le fait qu'il s'agisse d'un β -aminoacide naturel permet de s'affranchir de tout problème relatif au caractère énantiopur de l'aminoacide de départ.



Schéma 15 – L'acide aspartique : un α - et β -aminoacide

A notre connaissance, les oligomères ou polymères d'acide (L)-aspartique n'existent pas dans la nature. On trouve cependant quelques exemples d'oligomères synthétiques d'acide aspartique dans la littérature.¹¹⁶

Considérant ce dernier comme un β -aminoacide, la fonction acide carboxylique en α représente dans notre approche une chaîne latérale fonctionnelle et modifiable.

Dans le cas de synthèse d'homo-oligomères, les monomères amine et acide carboxylique sont classiquement obtenus au départ du même aminoacide, par déprotection de l'extrémité C-terminale et de l'extrémité N-terminale. Les oligomères ne seront pas synthétisés pas à pas : notre stratégie consiste en une démarche itérative. Les plateformes seront construites en allongeant de la chaîne de deux unités à chaque étape : nous accéderons donc aux dimères, tétramères, hexamères. Nous synthétiserons également les trimères.

i- Introduction du motif alcyne par une fonction amide

(a) Série Boc/OMe

Les fonctions amine et acide carboxylique de l'acide (L)-aspartique sont dans un premier temps protégées classiquement sous forme de carbamate de *tert*-butyle (Boc) et d'ester méthylique. L'ester méthylique **51** est formé en présence de chlorure d'acétyle dans le méthanol et le groupement Boc est introduit sur la fonction amine en présence de Boc_2O , de triéthylamine dans un mélange dioxane/eau.¹¹⁷

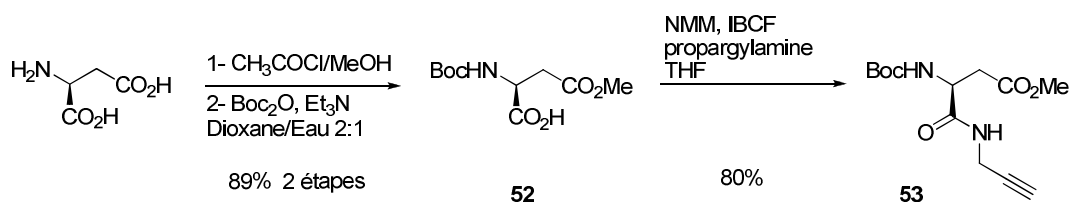


Schéma 16 – Synthèse du monomère 53

Le motif propargylique est ensuite introduit sur la fonction α -CO₂H par l'intermédiaire d'une fonction amide en utilisant la méthode des anhydrides mixtes par traitement de l'acide **52** en présence de *N*-méthylmorpholine, de chloroformate d'isobutyle et de propargylamine dans le THF.¹¹⁸ Après purification, on obtient le composé **53** avec un rendement de 80%.

L'obtention du dimère nécessite la préparation des partenaires amine et acide carboxylique du monomère **53**. L'amine est déprotégée quantitativement en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour donner le sel de TFA **54**.

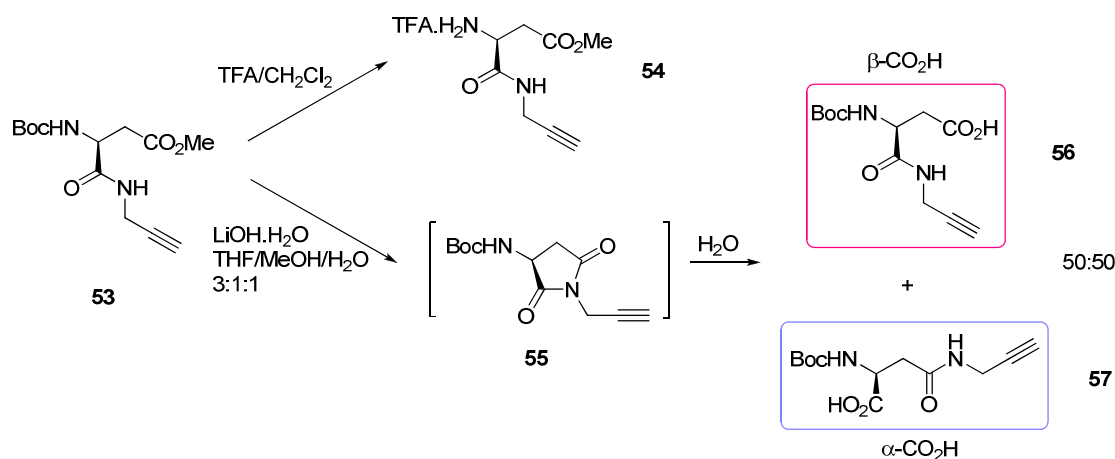


Schéma 17 – Déprotections du monomère 53 et formation d'aspartimide 55

Malheureusement, la saponification de l'ester méthylique ne conduit pas uniquement au β -aminoacide souhaité **56**. Ce dernier est obtenu en mélange avec l' α -aminoacide **57** dans des proportions 50:50 (Schéma 17). La présence de ce dernier s'explique par la formation d'un aspartimide **55** qui est ensuite réouvert¹¹⁹ en présence d'eau pour conduire aux deux acides. L'aspartimide, que l'on peut visualiser sur CCM au cours de la réaction, a été isolé et parfaitement caractérisé par la suite. Sa formation est très bien documentée dans la littérature.¹²⁰ Ce phénomène, propre aux dérivés de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, se produit en milieu acide et/ou basique.¹²¹ Il a été observé le plus fréquemment lors de synthèses supportées sur phase solide (SPPS)¹²² d'oligomères contenant des résidus

Asp où les amines étaient protégées sous forme de Boc mais plus particulièrement de Fmoc. La formation d'aspartimide a été très souvent observée lors de l'étape de déprotection du groupement Fmoc (pipéridine/DMF).

Dans notre cas, la formation d'aspartimide n'a été observée qu'en milieu basique, lors de la saponification. Nous avons donc tenté de moduler les conditions de saponification : LiOH.H₂O (3 équ.), LiOH.H₂O (1 équ.) et K₂CO₃¹²³ (1équ.) mais sans succès. Nous avons également tenté d'utiliser des conditions neutres avec LiI¹²⁴ mais en vain. Dans tous les cas, on observe la formation d'aspartimide et des deux acides **56** et **57** sur CCM dès les premières dix minutes de réaction.

❖ Mise au point d'une voie alternative

Compte tenu des problèmes rencontrés lors des diverses tentatives de saponification de l'ester méthylique sur le composé **53**, nous avons mis au point une voie d'obtention du monomère β-CO₂H indépendante de l'obtention du monomère -NH₂, qui elle ne pose aucun problème en présence de TFA/CH₂Cl₂.

L'acide β-CO₂H **56** est obtenu par ouverture d'un anhydride cyclique **59**¹²⁵ selon l'enchaînement décrit sur le Schéma 18. La fonction amine de l'acide (L)-aspartique est dans un premier temps protégée sous forme de carbamate de *tert*-butyle **58** en présence de Boc₂O et de soude dans un mélange dioxane/eau.¹²⁶ L'anhydride **59** est obtenu quantitativement en présence de DCC dans l'acétate d'éthyle¹²⁷ et il est utilisé sans purification.

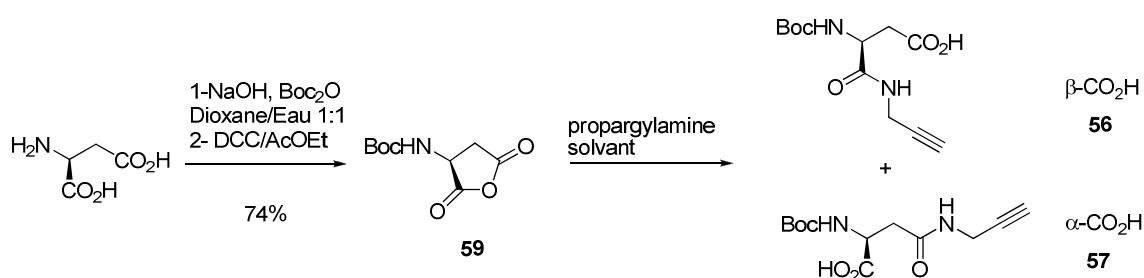


Schéma 18 – Accès au deux acides **56** et **57**

L'aminolyse de l'anhydride **59** en présence de propargylamine fournit un mélange des acides **56** et **57** qui sont séparés par chromatographie sur gel de silice.

La littérature rapporte que la nature du solvant peut avoir une influence importante sur la régiosélectivité de la réaction et donc sur le ratio α-CO₂H/β-CO₂H.¹²⁸ Les études menées montrent que les solvants aprotiques très polaires (DMSO, DMF, DMAC) conduisent à des mélanges contenant majoritairement l'acide α. Au contraire, les solvants apolaires ou peu

polaires (benzène, chloroforme, acétate d'éthyle, dichlorométhane...) conduisent à des mélanges contenant majoritairement l'acide β . Par ailleurs, il a été mis en évidence que la présence d'une petite quantité d'acide acétique favorisait la formation de l'acide β . Nous avons donc testé différents solvants : acétate d'éthyle, mélange acétate d'éthyle/acide acétique, dioxane. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant l'acétate d'éthyle et 1,2 équivalent de propargylamine : nous avons donc poursuivi en appliquant ces conditions optimisées qui permettent d'obtenir un mélange des deux acides **56** et **57** dans des proportions 60:40.

Ces derniers ont été obtenus purs et ont pu être caractérisés. La différence entre ces deux composés est visible sur CCM et sur le spectre RMN ^1H dans le DMSO- d_6 au niveau de certains protons, notamment au niveau de protons NH et NH' (respectivement NHBoc et NHpropargyl). Les principales caractéristiques de ces deux composés sont reportées dans le tableau suivant.

	CCM	RMN	$[\alpha]_D^{21}$
	Eluant AcOEt/MeOH 90 : 10	DMSO- d_6	
Acide β-CO₂H 56	Rf = 0,30	$\delta(\text{NHBoc}) = 6,90$ ppm $\delta(\text{NHpropargyl}) = 8,31$ ppm $\delta(\text{H}_3) = 4,27$ ppm $\delta(\text{H}_7) = 3,06$ ppm $\delta(\text{H}_2, \text{H}_2') = 2,45\text{-}2,54$ ppm	12,50 (c 1,12 – CHCl ₃)
Acide α-CO₂H 57	Rf = 0,61	$\delta(\text{NHBoc}) = 6,99$ ppm $\delta(\text{NHpropargyl}) = 8,22$ ppm $\delta(\text{H}_3) = 4,24$ ppm $\delta(\text{H}_7) = 3,09$ ppm $\delta(\text{H}_2, \text{H}_2') = 2,43\text{-}2,57$ ppm	47,70 (c 1,0 – CHCl ₃)

Tableau 2 – Données physico-chimiques des acides 56 et 57

Afin de confirmer que nous avons le régioisomère souhaité, l'acide **56** a été traité par DCC/DMAP dans le méthanol¹²⁹ afin de reformer l'ester **53**. Le spectre RMN ^1H et le point de fusion du composé obtenu sont conformes à ceux du monomère **53**.

Ainsi, ayant en notre possession les deux monomères (-NH₂ et -CO₂H), le dimère **60** a été obtenu en utilisant TBTU comme agent acylant en présence de triéthylamine dans le DMF.

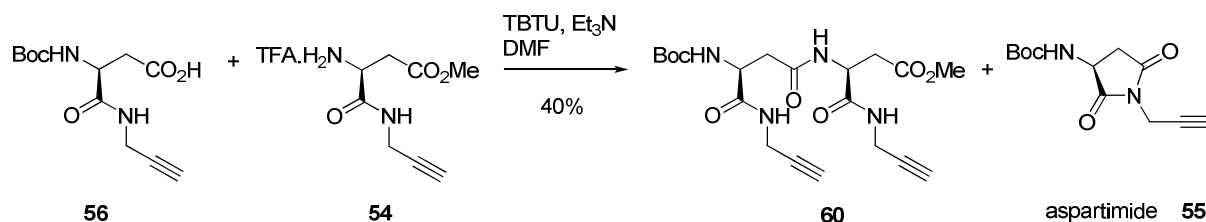


Schéma 19 – Accès au dimère 60

Le rendement modeste de 40 %, que nous n'avons pas cherché à optimiser, s'explique par la formation d'aspartimide **55** et par les difficultés de purification du composé qui est très peu soluble dans les solvants organiques usuels.

Cette voie de synthèse impose d'allonger le squelette peptidique d'une unité à chaque étape. Le trimère a donc été obtenu par couplage entre l'acide **56** et le sel de TFA **61** formé à partir du dimère **60**.

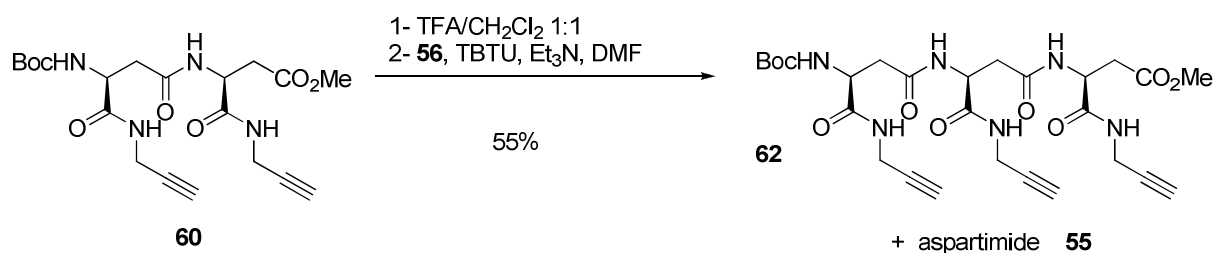


Schéma 20 – Accès au trimère 62

Dans le cas présent, la solubilité du trimère **62** est de nouveau un obstacle pour la purification par chromatographie sur gel de silice que nous avons réalisée. Il est cependant obtenu pur avec un rendement de 55% en produit isolé.

Conclusion

De très nombreux problèmes ont été rencontrés lors de la synthèse des oligomères dans la série Boc/OMe. La formation indésirable d'aspartimide **55** lors de la saponification de l'ester méthylique ne permet pas d'appliquer les conditions classiques de couplage peptidique. Ce problème a été momentanément contourné par la mise au point d'une voie alternative pour l'obtention de l'acide β-CO₂H **56**. Ceci nous a permis d'accéder au dimère **60** et au trimère **62**. Mais le caractère peu soluble de ces composés rend les purifications sur gel de silice difficiles et altère les rendements. D'autre part, l'allongement de la chaîne ne peut se faire que unité par unité, ce qui rend cette voie d'accès longue et peu convergente.

(b) Etude de groupements protecteurs

Compte tenu des observations faites précédemment, nous avons entamé une étude de différents couples de groupements protecteurs afin de pallier au problème récurrent de formation d'aspartimide. Ce dernier n'a été observé qu'en conditions basiques lors de la saponification de l'ester méthylique. Il a donc été décidé de conserver le groupement Boc sur l'amine et de choisir des esters se déprotégeant en conditions neutres ou légèrement acides pour protéger l'acide.

❖ Boc/OTCE

Un ester trichloroéthylique se déprotège dans des conditions douces de pH, en présence de zinc dans l'acide acétique. Ces conditions légèrement acides ne doivent pas, a priori, conduire à la formation d'aspartimide.

Au départ de l'acide **56**, précédemment obtenu par ouverture de l'anhydride **59**, nous avons tenté d'introduire l'ester trichloroéthylique. Plusieurs conditions, résumées sur le Schéma 21, ont été testées mais sans succès : dans tous les cas, le produit isolé après purification s'est avéré être l'aspartimide **55**.

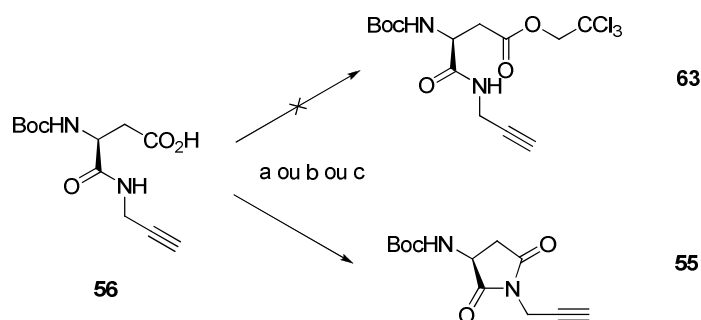


Schéma 21 – Conditions réactionnelles testées pour la synthèse du monomère 63

Dans un premier temps, des conditions classiques de couplage ont été mises en œuvre en utilisant le 2,2,2-trichloroéthanol avec d'une part DCC/DMAP dans un mélange MeCN/DMF¹³⁰ puis d'autre part avec TBTU/Et₃N dans le DMF. Dans ces conditions, aucune trace du produit attendu n'a été constatée. Il en a été de même en appliquant les conditions de la réaction de Mitsunobu : en présence de triphénylphosphine, de diisopropylazodicarboxylate DIAD et de 2,2,2-trichloroéthanol dans le THF, on a isolé uniquement l'aspartimide **55**. Les différentes conditions testées sont résumées dans le tableau suivant.

Essai	Réactifs de couplage	Quantité de réactifs de couplage	Solvant	Quantité de 2,2,2-trichloroéthanol	Résultats
a	DCC/DMAP	1,06éq. / 0,11éq.	CH ₃ CN/DMF 5 : 1	1,06éq.	Formation majoritaire d'aspartimide
	DCC/DMAP	1,06éq. / 0,11éq.	CH ₂ Cl ₂	1,06éq.	
	DCC/DMAP	1,06éq. / 0,11éq.	CH ₂ Cl ₂	25éq.	
b	TBTU/Et ₃ N	1,25éq. / 2,0éq.	DMF	2,0éq.	
c	PPh ₃ /DIAD	2,4éq. / 2,2éq.	THF	1,5éq.	

Tableau 3 - Conditions réactionnelles testées pour l'obtention de l'ester 63

Conclusion

Les tentatives d'estérification de l'acide en β se sont toutes soldées par un échec. Ceci est dû à la nucléophilie du 2,2,2-trichloroéthanol (inférieure au méthanol ou à l'éthanol) qui n'est pas suffisante ici pour faire pencher la balance en faveur de la formation de l'ester plutôt que de la cyclisation intramoléculaire aboutissant à la formation d'aspartimide.

❖ Boc/OTMSE

Devant les difficultés à introduire rapidement l'ester trichloroéthylique, nous avons orienté notre choix vers un ester triméthylsilyléthylique. En effet, ce type d'ester peut être éliminé en présence de fluorures.

Nous avons envisagé de former l'ester CO₂TMSE directement au départ de l'acide **56** en présence de DCC/DMAP et de 2-(triméthylsilyl)-éthanol dans le dichlorométhane. L'ester **64** est bien obtenu avec un rendement de 78 %.

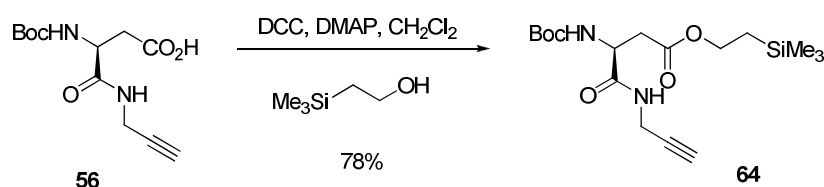


Schéma 22 – Accès au monomère 64

En présence de TBAF¹³¹ dans le THF, la déprotection de l'acide aboutit à un mélange de deux acides identifiés par CCM et par RMN. Le suivi CCM de la réaction a par ailleurs permis de mettre en évidence la formation d'aspartimide **55**.

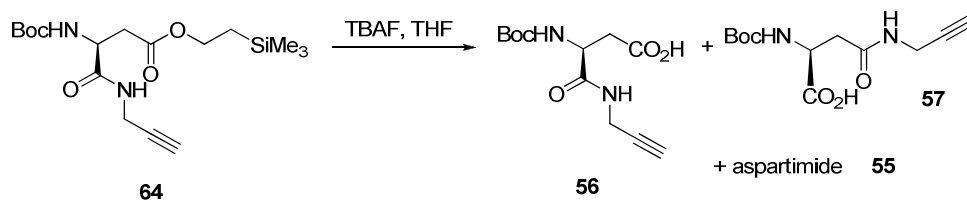


Schéma 23 – Déprotection de la fonction acide du monomère 64

De ce fait, la basicité du TBAF a été diminuée dans l'essai suivant en utilisant un mélange TBAF/APTS (3:1)¹³² puis (3:2). L'aspartimide **55** est éliminé au cours des lavages aqueux. On obtient l'acide **56** avec un rendement de 59%.

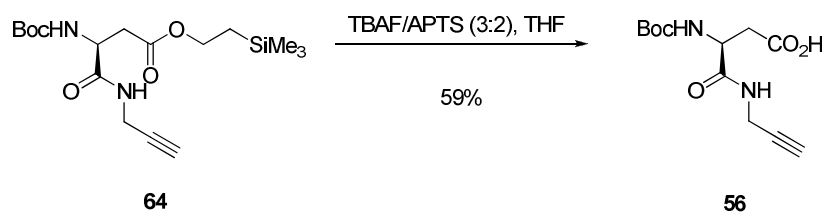


Schéma 24 – Accès à l'acide 56

Afin d'accéder au partenaire amine, le composé **64** a été traité par du TFA dans le dichlorométhane. Différentes proportions ont été testées (1:5 – 1:2,5 – 1:3,3)¹³³ mais le suivi CCM de la réaction montre invariablement la présence de deux composés majoritaires, non isolés. L'un pourrait correspondre à l'amine souhaitée **65** et l'autre, beaucoup plus polaire, à un composé totalement déprotégé (spectre RMN ¹H du brut).

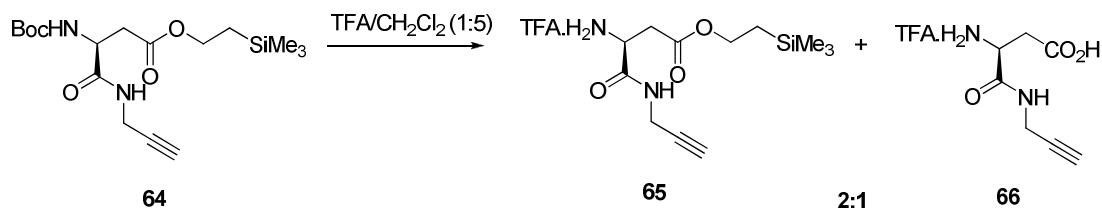


Schéma 25 – Déprotection de la fonction amine sur le monomère 64

(c) Fmoc/OtBu

Notre choix s'est porté sur le couple de groupements protecteurs Fmoc/CO₂tBu, et ce, pour deux raisons. Les informations concernant la formation d'aspartimide sont largement relayées dans la littérature. En effet, de nombreuses études ont été menées afin de limiter sa formation lors de la synthèse d'oligopeptides. Il s'avère que la présence d'un ester d'alcool tertiaire très encombré peut permettre de limiter, voire d'empêcher totalement la formation d'aspartimide.¹³⁴ De plus, le Fmoc-Asp(OtBu)-OH est un produit commercial, relativement abordable.

La propargylamine est couplée à la fonction α-CO₂H du Fmoc-Asp(OtBu)-OH en présence de EDCi et d'HOBt dans le dichlorométhane. Le propargylamide **67** est obtenu avec un rendement de 80%. Dans le même temps que se déroulaient nos travaux, ce composé a été synthétisé par Ziegler.¹³⁵

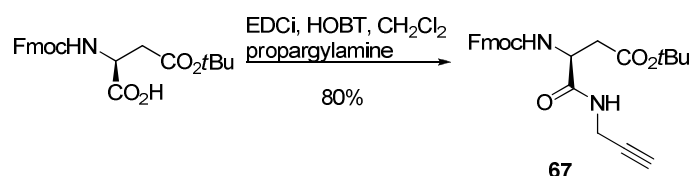


Schéma 26 – Accès au propargylamide 67

La déprotection de l'acide est réalisée classiquement par du TFA dans le dichlorométhane. On obtient l'acide **68** quantitativement. La fonction amine est déprotégée par de la diéthylamine dans l'acétonitrile. Après purification, on obtient l'amine libre **69** avec un rendement peu satisfaisant de 40%. Elle est finalement obtenue quantitativement, après purification, en traitant le carbamate **67** par de la pipéridine à 20% dans le DMF. Aucune trace d'aspartimide n'a été observée. La littérature rapporte cependant des exemples de formation d'aspartimide en présence d'ester *tert*-butylique. Heureusement, cela n'a pas été notre cas.

On accède au dimère en appliquant les conditions de couplage classiques, à savoir en présence d'EDCi, de HOBt dans le dichlorométhane. On obtient le dimère **70** avec un rendement de 82%.

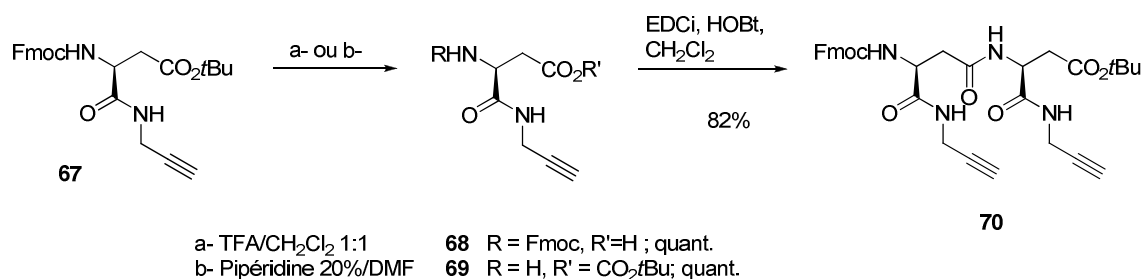


Schéma 27 – Synthèse du dimère 70

Le dimère **70** est très peu soluble dans les solvants organiques classiques rendant extraction et lavage impossibles. N'étant pas ou peu soluble dans l'eau, il peut être lavé sous forme solide. Des lavages successifs avec de l'acide citrique 5%, puis avec une solution saturée en NaHCO₃ et enfin avec de l'eau permettent de l'obtenir avec une excellente pureté (HPLC > 99%, RMN).

Le trimère **73** est obtenu par couplage entre le dimère –NH₂ **71** et le monomère –CO₂H **68** (Schéma 28). La déprotection du dimère **70** en présence de diéthylamine dans l'acétonitrile permet l'obtention de l'amine libre **71** de manière quantitative. Le trimère étant peu soluble dans le CH₂Cl₂, la réaction a été menée dans un mélange CH₂Cl₂/DMF en présence de EDCi/HOBt. Les lavages aqueux successifs comme décrits précédemment sur le dimère nous ont permis d'obtenir le trimère **73** avec une très bonne pureté (HPLC > 99%).

Le tétramère **74** est obtenu dans les mêmes conditions que le trimère, par couplage entre le dimère –NH₂ **71** et le dimère –CO₂H **72**, ce dernier étant obtenu quantitativement par traitement du dimère **70** en présence de TFA dans le dichlorométhane (Schéma 28). Nous avons obtenu le tétramère **74** après lavages sous forme solide avec un rendement de 73%. Les spectres RMN ¹H et ¹³C dans la pyridine-d₅ montrent une pureté très satisfaisante. Le profil de pureté est difficilement obtenu par HPLC pour des raisons d'insolubilité.

De la même façon, l'hexamère **76** est obtenu par couplage entre le dimère –NH₂ **70** et le tétramère –CO₂H **74**, obtenu quantitativement par traitement du tétramère **73** en présence de TFA dans le CH₂Cl₂ (Schéma 28). L'hexamère étant absolument insoluble dans un mélange CH₂Cl₂/DMF 2:1, le couplage est donc réalisé dans le DMF pur, solvant dans lequel la solubilité n'est tout de même pas totale. En même temps que se déroulaient nos travaux, Kaur et coll.¹³⁶ ont publié la synthèse d'un hexamère dérivé de l'acide (L)-aspartique fonctionnalisés par des amides latéraux.

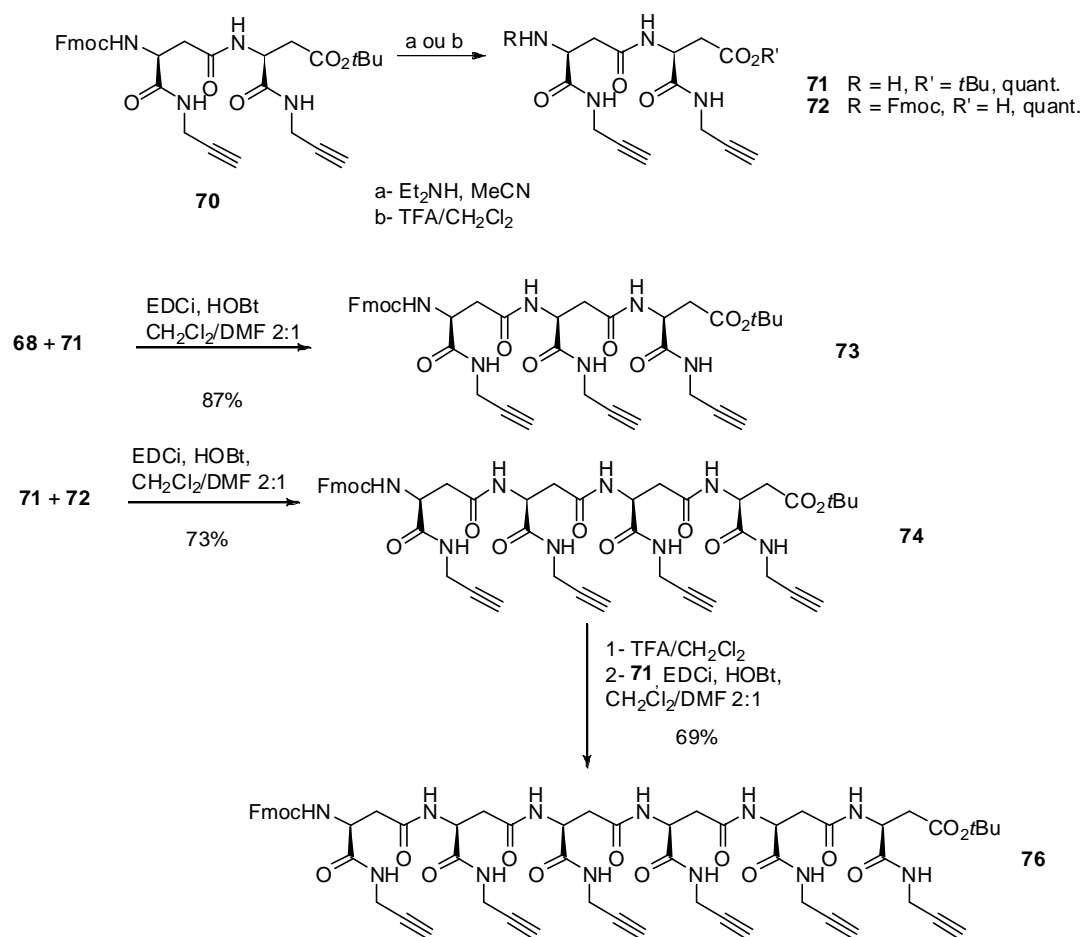


Schéma 28 – Accès aux oligomères 73, 74 et 76

A ce jour, seule l'analyse par HR-MS prouve que l'hexamère **76** a été obtenu. En effet, ce dernier est très peu soluble voire totalement insoluble dans les solvants organiques classiques. De ce fait, l'analyse par RMN n'a pas pu être effectuée dans la pyridine-d₅, solvant utilisé pour les oligomères plus courts. Seul le DMSO-d₆ nous a permis d'enregistrer un spectre RMN ¹H mais ce dernier est mal résolu. Par ailleurs, aucun profil de pureté n'a pu être obtenu par HPLC.

Afin de le caractériser, nous avons tenté de le déprotéger en partie au niveau de l'amine. Cette tentative s'est soldée par un échec : la solubilité étant insuffisante dans le DMF, la déprotection de l'extrémité N-terminale en présence de pipéridine à 20% dans le DMF n'a pas donné l'amine souhaitée.

Conclusion

Nous avons donc réussi à synthétiser tous les oligomères souhaités dans cette série, du monomère jusqu'à l'hexamère, avec de bons rendements.

ii- Introduction du motif alcyne sous forme d'éther

En parallèle des travaux menés précédemment pour l'obtention des oligomères β -peptidiques présentant des chaînes latérales de type propargylamide, nous avons étudié des voies d'introduction du motif propargylique sous forme d'éther. L'objectif était d'obtenir des composés présentant une meilleure solubilité dans les solvants organiques et de diminuer la complexité des oligomères en vue de l'analyse conformationnelle (absence d'amides latéraux).

Les différentes voies explorées ont pour substrat de départ commun l'alcool **77**. Il est obtenu par réduction de la fonction α -CO₂H du Boc-Asp(OMe)-OH **52**. La fonction acide en α est tout d'abord activée sous forme d'ester en présence de *N*-hydroxysuccinimide en utilisant le DCC dans l'acétate d'éthyle. La réduction est effectuée par NaBH₄ dans un mélange THF/H₂O pour donner l'alcool **77** avec un rendement de 68% après purification.¹³⁷

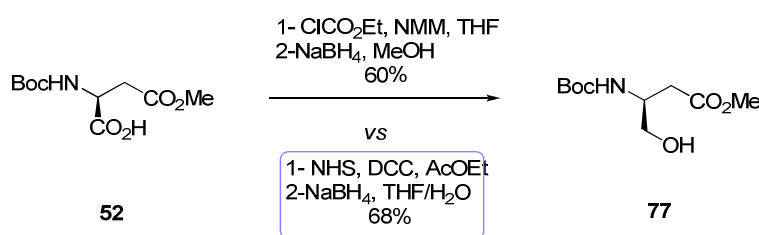


Schéma 29 – Conditions testées pour l'obtention de l'alcool **77**

L'alcool **77** a également été obtenu en formant un anhydride mixte à partir du Boc-Asp(OMe)-OH en présence de chloroformate d'éthyle et de *N*-méthylmorpholine dans le THF, lequel est ensuite réduit par NaBH₄ dans le méthanol.¹³⁸ Après purification, on obtenait l'alcool **77** avec un rendement moins satisfaisant de 60%.

(a) Alkylation en présence de (Bu₃Sn)₂O

Dans un premier temps, il a été envisagé d'utiliser l'oxyde de bis-(tributylétain) pour procéder à l'alkylation de l'alcool **77**. Ce dernier a donc été traité par 0,75 éq. de (Bu₃Sn)₂O en présence de bromure de propargyle (6,0 éq.) et de bromure de tétrabutyle-ammonium (1,0 éq.) dans le toluène.¹³⁹ Un milieu complexe a été obtenu et n'a pas pu être purifié.

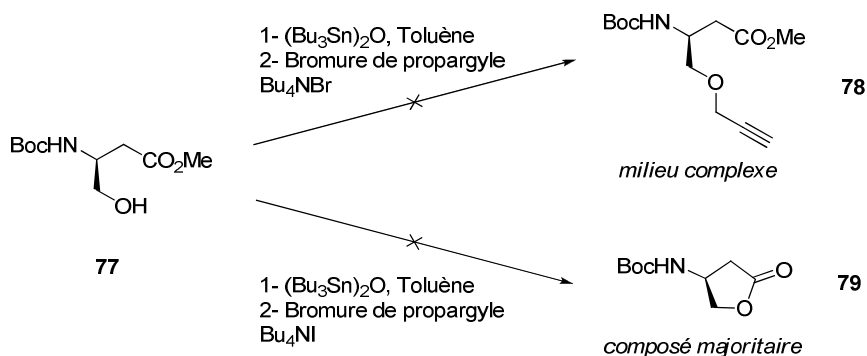


Schéma 30 – Essai d'alkylation de l'alcool 77 en présence de bromure de propargyle

Une deuxième tentative a été réalisée dans des conditions similaires en utilisant Bu_4NI à la place de Bu_4NBr . Après purification, le composé majoritaire isolé est la lactone **79**.

(b) Alkylation par formation d'un imidate intermédiaire

La deuxième voie testée consistait à remplacer le bromure de propargyle par un équivalent plus réactif, à savoir un imidate. Comme précédemment avec les éthers de tributylétain, la réaction d'alkylation passant par un imidate ne requiert pas de conditions basiques.

L'imidate **80** est obtenu par traitement de 3-butyn-1-ol par de l'hydrure de sodium en présence de trichloroacétonitrile.¹⁴⁰ L'alkylation de l'alcool **77** est ensuite réalisée en présence de 2 équivalents d'imidate **80** et d'une quantité catalytique d'acide triflique TfOH ¹⁴¹ dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}$ 1:1.

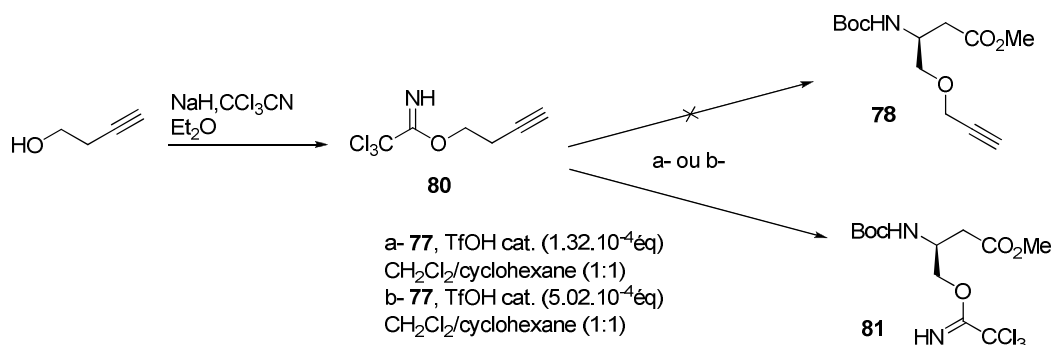


Schéma 31 – Essai d'alkylation de l'alcool 77 passant par un imidate intermédiaire

Aucun des deux essais effectués n'a permis d'obtenir le composé attendu. Après purification, le seul composé isolé des milieux réactionnels complexes est semble-t-il le trichloroacétimide **81**. Ce produit, obtenu en très faibles quantités, semble être issu d'un

transfert de l'imidate sur l'alcool **77**. Il existe en effet de grandes similitudes entre les spectres RMN ^1H de composés **77** et **81**. On note de plus la présence du signal caractéristique du proton NH de l'imidate à 8,37 ppm. Par ailleurs, le traitement en milieu fortement acide, même en quantités catalytiques, ne doit pas laisser le groupement Boc intact.

(c) Alkylation en milieu basique

Une autre possibilité pour former l'éther **83** consiste en une réaction d'alkylation réalisée directement au départ de l'alcool **77** en présence de NaH et de bromure de propargyle.¹⁴² Trois essais ont été réalisés (Tableau 4) mais n'ont pas permis de former le produit attendu. Dans tous les cas, le composé majoritaire obtenu après purification est la lactone **79** qui a pu être caractérisée et qui est identique à celle isolée lors des essais d'alkylation en présence de $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$.

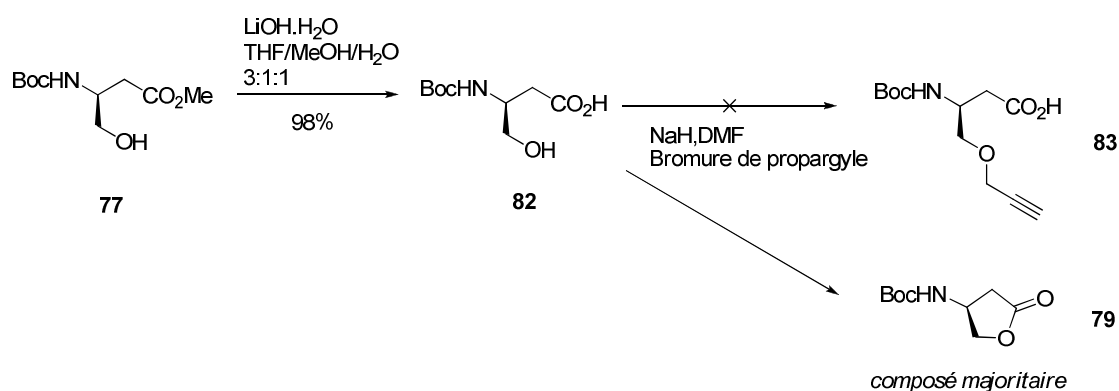


Schéma 32 – Essai d'alkylation de l'alcool **77** en milieu basique

Essai	NaH	Bromure de propargyle	Solvant	Conditions expérimentales
1	2,4 éq.	1,4 éq.	DMF	0°C → RT
2	2,4 éq.	1,4 éq.	DMF	Sous atmosphère inerte 0°C → RT
3	4,0 éq.	2,0 éq.	DMF	Sous atmosphère inerte 0°C → RT

Tableau 4 – Conditions testées pour l'alkylation de l'alcool **77**

Aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir le produit d'alkylation attendu. Nous avons donc écarté cette voie de synthèse du fait des difficultés rencontrées.

b- Plateformes de type « azoture »

Dans le cas présent, les plateformes portent des fonctions azotures qui représentent l'un des deux partenaires dans les réactions de CuAAC. Les unités saccharidiques devront être fonctionnalisées par des motifs alcynes.

i- Accès au monomère

Le monomère nécessaire à l'obtention des plateformes de type « azoture » est obtenu au départ de l'alcool **77** précédemment synthétisé. Ce dernier est transformé en son analogue iodé **84** en présence de triphénylphosphine, d'imidazole et de diiode dans un mélange Et₂O/CH₂Cl₂.¹⁴³ La substitution de l'iode par un azoture s'effectue par NaN₃ dans le DMF à 60°C. Le monomère **85**¹³⁸ est obtenu avec un rendement de 93% et une très bonne pureté.

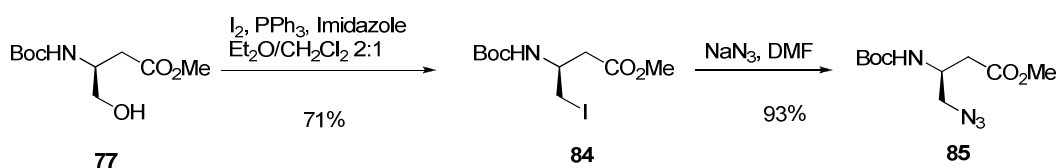


Schéma 33 – Accès au monomère « azoture » **85**

ii- Accès aux oligomères

La déprotection de la fonction amine se fait en présence d'acide trifluoroacétique (Schéma 34). On obtient donc l'amine sous forme de sel de TFA **86** qui est utilisé sans purification. La saponification de l'ester méthylique est effectuée par traitement avec de la lithine LiOH.H₂O dans un mélange THF/H₂O/MeOH 3:1:1. On obtient l'acide correspondant **87** qui est utilisé sans purification. Le dimère **88**, intermédiaire qui va nous permettre d'accéder à l'ensemble des oligomères plus longs, est obtenu par couplage avec EDCi/HOBt en présence de triéthylamine entre l'acide **87** et l'amine **86** avec un très bon rendement de 82%.

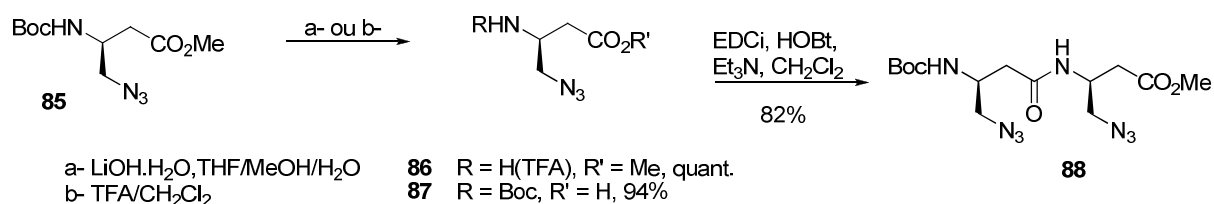


Schéma 34 – Synthèse du dimère 88

Pour l'obtention des oligomères plus longs, la composition du solvant varie en fonction de la longueur de la chaîne pour des questions de solubilité. A partir du dimère, l'allongement de la chaîne peptidique est réalisé de façon itérative, deux unités par deux unités. Le trimère **91** est obtenu par couplage entre le dimère amine **89** et le monomère acide **87** avec un rendement très satisfaisant. Le tétramère **92** est obtenu avec un très bon rendement par couplage entre le dimère amine **89** et le dimère acide **90**. Le tétramère **92** est finalement déprotégé quantitativement au niveau de l'amine puis couplé au dimère acide **90** pour fournir l'hexamère **94** avec un très bon rendement.

L'ensemble de la séquence réactionnelle est résumée sur le Schéma 35.

On obtient donc l'ensemble des oligomères avec des rendements très satisfaisants qui restent relativement constants avec l'allongement de la chaîne peptidique.

Conclusion

Dans cette série « azoture », nous avons donc obtenu tous les oligomères, excepté le pentamère, avec de très bons rendements. A notre connaissance, ces structures sont les premiers β -peptides « poly-azoture » synthétisés à ce jour.

c- Plateformes de type « oxime »

Les plateformes de type « oxime » doivent porter une des deux fonctions partenaires pour l'établissement d'une liaison de type oxime. Nous avons choisi de commencer par des plateformes fonctionnalisées par des groupes aminooxy, les unités saccharidiques porteront la fonction aldéhyde. La fonction aminooxy devra être protégée afin de permettre l'allongement de la chaîne peptidique par couplage peptidique.

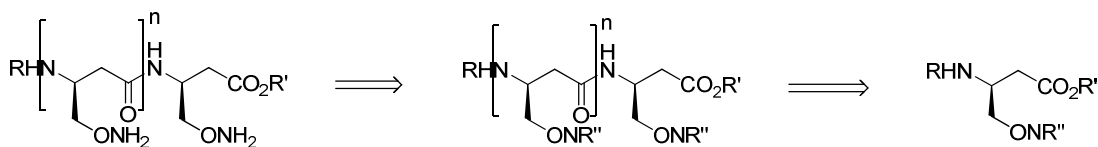


Schéma 36 – Schéma rétrosynthétique pour l'accès aux oligomères de la série « oxime »

Deux voies d'accès aux oligomères ont principalement été étudiées et ont pour réactif de départ commun l'alcool **77**.

i- Voie « Phtalimide »

La synthèse débute par l'introduction de la fonction aminooxy sur le monomère qui servira d'unité de base pour l'obtention des oligomères. Dans le cas présent, la fonction aminooxy sera masquée sous forme de phtalimide qui est introduit au départ de l'alcool **77** par une réaction de Mitsunobu en présence de triphénylphosphine, de DIAD et de *N*-hydroxyphtalimide dans le THF.¹⁴⁴

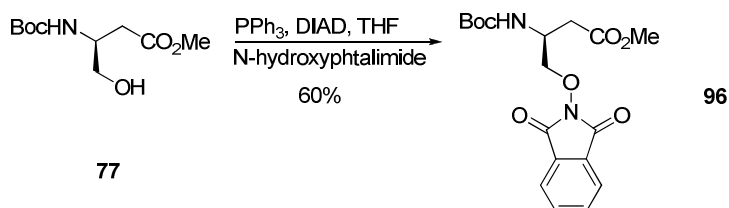


Schéma 37 – Synthèse du phtalimide 96

Le phthalimide **96** est obtenu avec un rendement de 60%. La purification de ce composé pose quelques problèmes : deux ou trois chromatographies sur gel de silice sont, la plupart du temps, nécessaires pour éliminer toute trace de dihydro-diisopropylazodicarboxylate (forme réduite du DIAD), sous-produit de la réaction qui cristallise avec le phthalimide **96** et qui co-élue lors de la chromatographie sur gel de silice. En présence de DEAD, la réaction aboutit à un produit brut dont la purification ne pose pas de problème : on obtient le phthalimide **96** avec un rendement de 80% après deux purifications.

La fonction amine du composé **96** est déprotégée quantitativement en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour donner l'amine sous forme de sel de TFA **97** (Schéma 38).

La déprotection de l'acide est réalisée en présence de lithine dans un mélange THF/MeOH/H₂O 3:1:1. A ce stade, nous n'avons pas obtenu l'acide carboxylique attendu **98** pur. Celui-ci est contaminé par un sous-produit dont la structure n'a pu être élucidée mais qui semble correspondre à un produit d'ouverture du groupement phthalimide. Il semblerait que dans cette topologie, le groupement phthalimide ne soit pas aussi stable que prévu. Afin de pallier à ce problème, nous avons testé d'autres conditions de saponification de l'ester méthylique. Les mêmes résultats ont été obtenus avec K₂CO₃ dans un mélange MeOH/H₂O et avec LiI dans l'acétate d'éthyle.

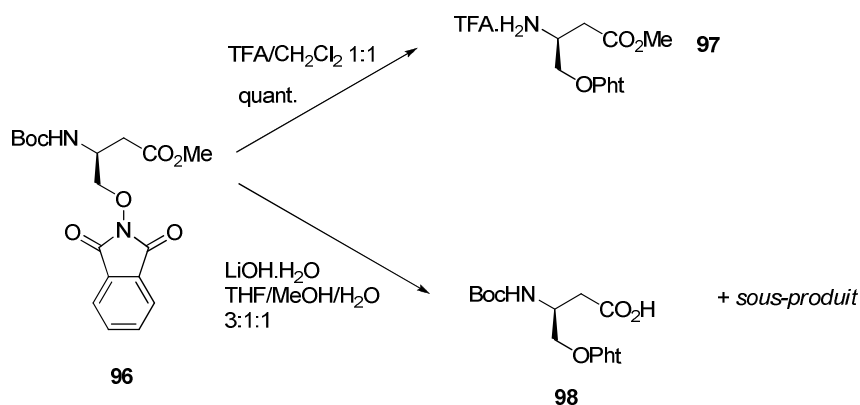


Schéma 38 – Déprotection du monomère 96

La synthèse du dimère a tout de même été tentée en utilisant le sel de TFA **97** et le mélange contenant l'acide **98**. Le couplage est réalisé en présence de TBTU, de triéthylamine dans le DMF et aboutit à un mélange difficilement purifiable. En revanche, après couplage en présence d'EDCI, de HOBt et de triéthylamine dans le CH₂Cl₂, le dimère **99** est isolé avec un rendement de 25%.

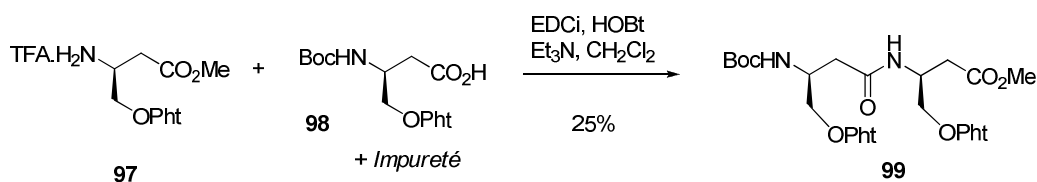


Schéma 39 – Accès au dimère 99

ii- Voie « Alloc »

Les difficultés rencontrées précédemment nous ont amené à changer la nature du groupement protecteur de la fonction aminooxy, tout en assurant l'orthogonalité entre les différents groupements protecteurs déjà présents. Il s'est avéré qu'un carbamate allylique Alloc serait compatible avec le groupement Boc et avec l'ester méthylique étant donné que sa déprotection est réalisée en présence de Pd⁰.

Deux approches ont été envisagées et menées en parallèle. La première consiste en l'introduction directe du motif aminooxy protégé obtenu au départ de l'alcool **77**. La deuxième consiste en l'introduction du groupement Alloc après déprotection du phtalimide.

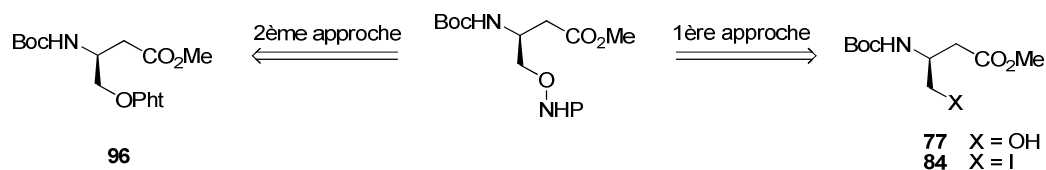


Schéma 40 – Stratégies pour l'accès aux monomères

(a) 1^{ère} approche

La première approche envisagée consiste en l'introduction directe du motif aminooxy sous forme protégée. Pour ce faire, nous avons dû préparer l'hydroxylamine **100**. L'hydroxylamine, sous sa forme chlorhydrate, est traitée par du chloroformate allylique en présence de soude dans l'eau¹⁴⁵ pour donner l'hydroxylamine protégée **100** avec un rendement de 96%.

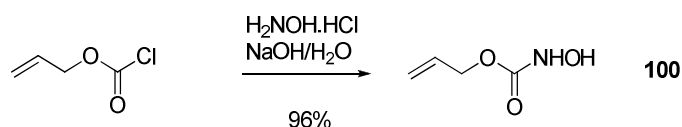


Schéma 41 – Synthèse de l'hydroxylamine protégée 100

❖ Au départ de l'alcool 77

L'alcool **77** et l'hydroxylamine **100** sont engagés dans une réaction de Mitsunobu en présence de triphénylphosphine, de DIAD dans le THF :¹⁴⁴

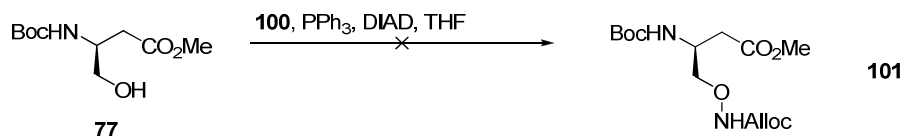


Schéma 42 – Essai de synthèse du monomère **101** par réaction de Mitsunobu

Aucune réaction n'est observée. Le suivi de la réaction ne montre pas la formation de l'intermédiaire bétaine, caractérisée par une coloration marron-rouge très intense du milieu réactionnel. Deux essais ont été réalisés dans les mêmes conditions et ont abouti au même résultat. Cette absence de réactivité doit vraisemblablement provenir de l'acidité insuffisante du groupement hydroxyle de l'hydroxylamine.

❖ Au départ du dérivé iodé 84

Nous avons également tenté d'introduire directement l'hydroxylamine **100** par substitution sur le dérivé iodé **84** en présence d'hydrure de sodium dans le DMF.

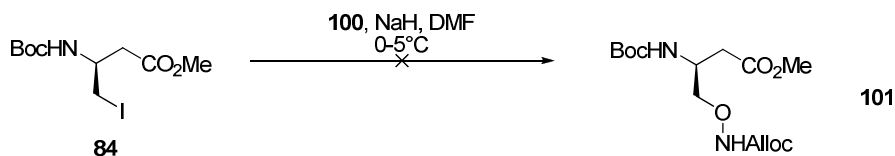


Schéma 43 – Essai de synthèse du monomère **101** par substitution

On obtient un mélange complexe de sous-produits qui n'a pas pu être purifié. L'étude du spectre RMN du brut ne permet pas de voir si le produit attendu **101** s'est formé. En revanche, il semblerait qu'on ait des traces assez importantes d'un composé issu d'une réaction d'élimination (présence de protons éthyléniques sur le spectre RMN ¹H) par arrachement du proton H₃, arrachement rendu possible dans les conditions de la réaction.

(b) 2^{ème} approche

Le groupe phthalimide est éliminé par hydrazinolyse en présence d'hydrazine monohydratée dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH.¹⁴⁶ L'aminooxy obtenu **102** semblant visuellement instable, il est utilisé sans purification. Il est protégé sous forme d'Alloc en présence de chloroformate allylique, de DIPEA dans le CH₂Cl₂¹⁴⁷ pour donner le monomère protégé **101** avec un rendement de 74% après purification.

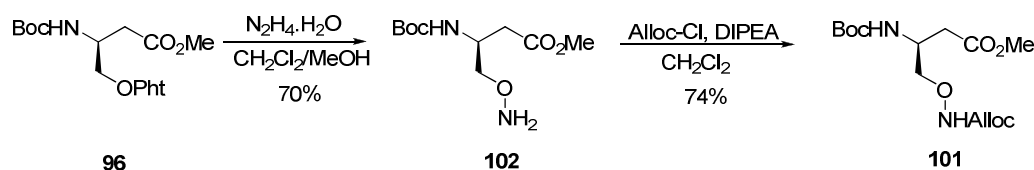


Schéma 44 – Accès à l'aminooxy protégé 101

A ce stade, nous avons souhaité tester la déprotection de l'aminooxy afin d'évaluer si le groupe Alloc était bien adéquat dans notre cas. Un carbamate allylique se déprotège en présence d'espèces palladiées Pd⁰ telles que Pd(PPh₃)₄,¹⁴⁸ Pd(dba)₂,¹⁴⁹ Pd(OAc)₂/TPPTS,¹⁵⁰ Pd-C.¹⁵¹ L'utilisation d'acide formique ou d'espèces nucléophiles telles que la morpholine,¹⁴⁸ Bu₃SnH,¹⁵² PhSiH₃¹⁵³ est indispensable. Nous avons choisi d'utiliser le Pd(PPh₃)₄, qui est commercial, en présence de morpholine.¹⁴⁸

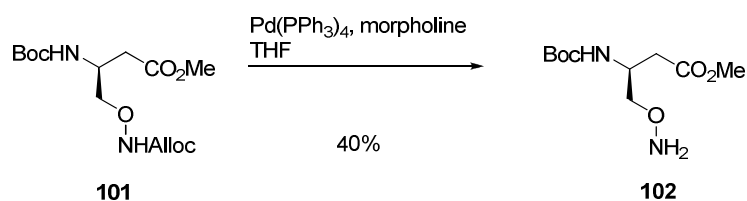


Schéma 45 – Essai de déprotection de l'aminooxy 101

L'aminooxy attendu **102** est obtenu avec un rendement de 40% après chromatographie sur gel de silice. Ce rendement modeste s'explique par la difficulté de purifier des aminooxys par cette technique.

Nous avons donc considéré que, pour notre étude, le groupe Alloc pouvait convenir comme groupement protecteur de l'aminooxy. Nous avons alors tenté de synthétiser les oligomères correspondants.

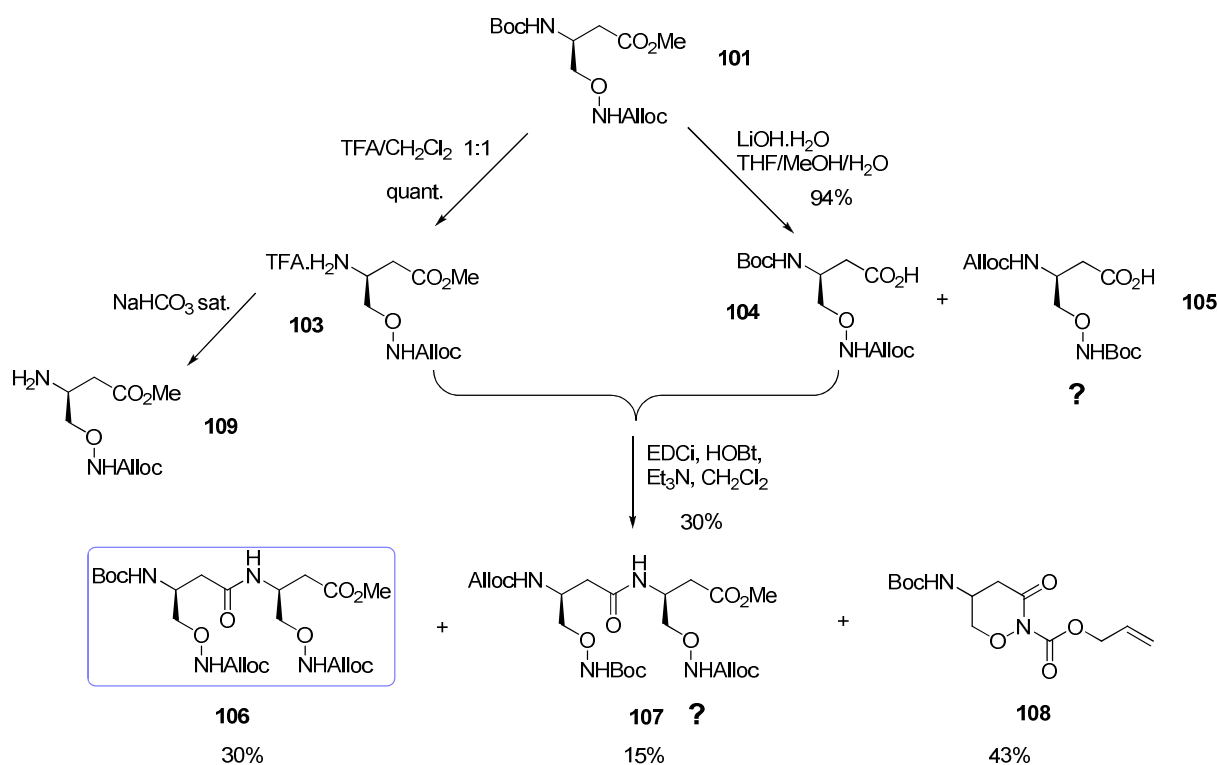


Schéma 46 – Accès au dimère 106

Dans un premier temps, l'amine **103** est obtenue quantitativement sous forme de sel de TFA après traitement du composé **101** en présence de TFA dans le dichlorométhane. La saponification de l'ester méthylique en présence de lithine dans un mélange THF/H₂O/MeOH a abouti à un mélange 73:27 de deux composés, mis en évidence lors du suivi CCM de la réaction (R_f différents) et confirmé par le spectre RMN ¹H du mélange (présence de deux résonnances différentes pour les protons NHBoc et NHAlloc). L'HR-MS du « mélange » donne le pic moléculaire attendu et l'étude par LC-MS a montré la présence de deux composés de même masse molaire. A ce stade, les deux composés obtenus n'ont pas été isolés. Nous n'avons pas pu identifier le deuxième composé, à savoir s'il s'agit d'une forme rotamère très stable ou d'un produit issu d'un échange entre les groupements protecteurs Boc et Alloc. Il est à noter qu'en présence de LiI dans l'acétate d'éthyle, le résultat est identique.

Partant de l'hypothèse que les deux composés constituant le mélange sont deux acides dont celui qui nous intéresse, nous avons tenté la réaction de couplage en vue d'obtenir le dimère en présence de EDCi/HOBt. Nous avons obtenu un mélange de trois composés qui ont été isolés et caractérisés. Deux d'entre eux présentent le même pic moléculaire (HR-MS) et des spectres RMN ¹H très similaires. Ceci abonderait dans le sens de l'hypothèse de deux formes acides obtenues à l'issue de la saponification.

CCM		RMN
Eluant CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80 : 20		CDCl ₃
Dimère 106	Rf = 0,55	$\delta(\text{NH}_A) = 5,70 \text{ ppm}$; $\delta(\text{NH}_B) = 8,31 \text{ ppm}$ $\delta(\text{NHAlloc}) = 8,41 - 8,48 \text{ ppm}$ $\delta(\text{H}_{3A}) = 4,13 \text{ ppm}$; $\delta(\text{H}_{3B}) = 4,55 \text{ ppm}$
Dimère 107	Rf = 0,50	$\delta(\text{NH}_A) = 5,67 \text{ ppm}$; $\delta(\text{NH}_B) = 7,18 \text{ ppm}$ $\delta(\text{NHAlloc}) = 8,15 - 8,34 \text{ ppm}$ $\delta(\text{H}_{3A}) = 4,15 \text{ ppm}$; $\delta(\text{H}_{3B}) = 4,56 \text{ ppm}$

Tableau 5 - Principales différences physico-chimiques entre les dimères 106 et 107

Le troisième composé **108**, isolé et caractérisé, est un produit de cyclisation intramoléculaire faisant intervenir l'atome d'azote de l'aminooxy et le groupe carbonyle de l'acide **104**. Après purification, on obtient majoritairement l'impureté **108** à hauteur de 43%. Les deux dimères **106** et **107** sont respectivement présents à hauteur de 30% et 15%.

Nous avons cherché à minimiser la formation de ce composé cyclique **108** en modulant la basicité du milieu. Pour ce faire, nous nous sommes inspiré de travaux¹⁵⁴ relatifs à l'« overacylation » de la fonction –NH-O- en fonction de la base utilisée lors des couplages peptidiques. Nous avons ainsi testé différents réactifs de couplage avec différentes bases. Le couplage a également été réalisé en utilisant l'amine sous forme de sel de TFA **103** et sous forme libre **109**, obtenue par neutralisation de **103** par une solution saturée en NaHCO₃ (Schéma 48). L'utilisation de l'amine libre nous a permis, dans certains cas, de nous affranchir totalement de l'utilisation de la base.

Les différentes conditions testées sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 6).

Amine de départ	Réactifs de couplage	Quantité de réactifs de couplage	Base	Solvants	Rdt
Sel de TFA 103	EDCi/HOBt	1,2 éq. / 1,2 éq.	Et ₃ N (1,2 éq.)	CH ₂ Cl ₂	30% ^a
Sel de TFA 103	EDCi/HOBt	1,2 éq. / 1,2 éq.	Et ₃ N (1,0 éq.)	CH ₂ Cl ₂	Non isolé
Sel de TFA 103	TBTU	1,25 éq.	Et ₃ N (2,0 éq.)	DMF	45% ^a
Sel de TFA 103	FDPP	1,2 éq.	DIPEA (3,0 éq.)	DMF	41% ^a
Amine 109	FDPP	1,2 éq.	DIPEA (3,0 éq.)	DMF	53% ^a
Amine 109	EDCi/HOBt	1,2 éq. / 1,2 éq.	-	CH ₂ Cl ₂	39% ^a
Amine 109	HATU	1,0 éq.	2,4,6-Collidine	CH ₂ Cl ₂ /DMF (4:1)	59% ^a
Amine 109	FDPP	1,2 éq.	2,4,6-Collidine	DMF	27% ^a

^a Rendement en dimère **106** après purification

Tableau 6 – Conditions réactionnelles testées pour l'obtention du dimère 106

A l'issue de cette étude, nous avons réussi à obtenir le dimère **106** avec un rendement optimisé de 59% en utilisant HATU en présence de 2,4,6-Collidine, dont le pKa de 7,4 est inférieur à celui de la DIPEA (pKa = 10,1) ou de la triéthylamine (pKa = 10,6). Dans ces conditions, la formation du composé cyclique **108** n'est plus observée.

Nous avons ensuite entrepris de synthétiser le trimère en appliquant les conditions mises au point ci-dessus. Le dimère **106** est déprotégé en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Après neutralisation par une solution saturée de NaHCO₃, on obtient l'amine libre **110** qui est engagée dans la réaction de couplage avec l'acide **104**, contaminé, comme évoqué précédemment, avec ce que l'on suppose être un autre acide carboxylique. Le trimère **111** est obtenu avec un rendement de 53%. Ici aussi, on observe par CCM la présence d'un second composé de R_f proche qui n'a pas été isolé. Ce second composé pourrait correspondre à un trimère dont l'un des groupes Alloc serait interchangé avec le groupe Boc.

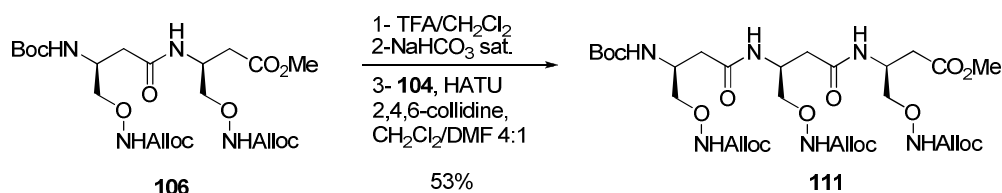


Schéma 47 – Accès au trimère 111

Pour la formation du tétramère, nous avons envisagé de coupler deux dimères. L'issue de la saponification de l'ester méthylique **106** est semblable à ce que nous avons observé lors de la saponification du monomère **101**. L'analyse du mélange (RMN, HR-MS, LC-MS) tend à montrer que nous sommes de nouveau en présence de deux acides. Les différences spectrales en RMN ^1H sont cependant moins évidentes que pour les deux dimères **106** et **107** : on n'observe qu'un léger épaulement au niveau des protons NHAlloc. Malgré les difficultés inhérentes à la saponification, le tétramère **113** est obtenu avec un rendement de 59%.

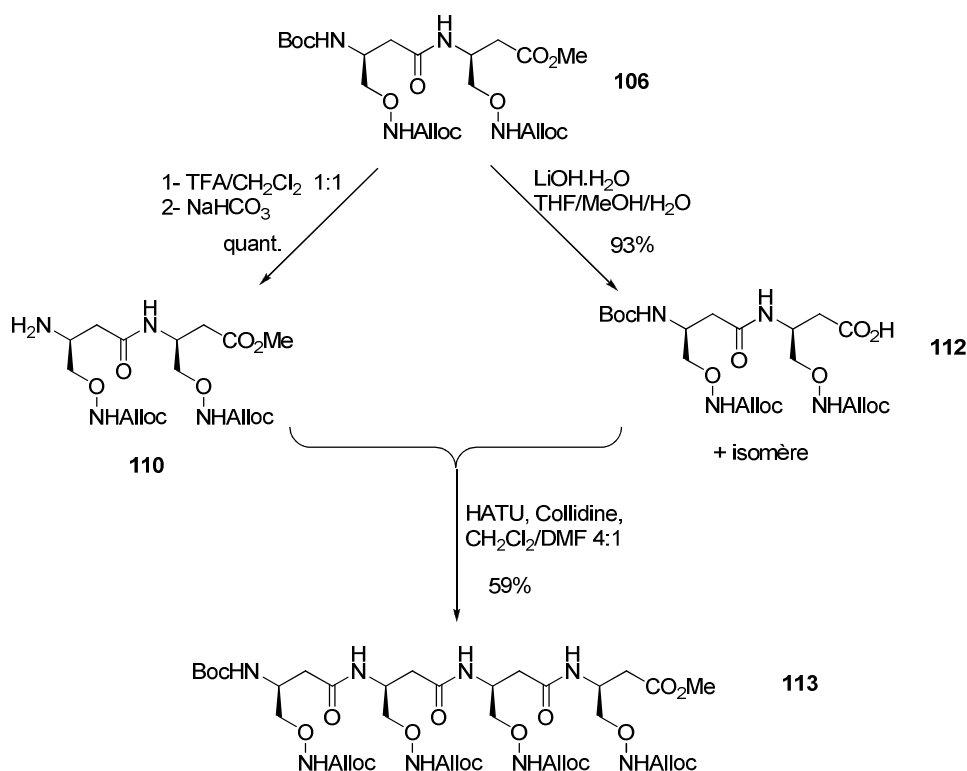


Schéma 48 – Accès au tétramère 113

Conclusion

Malgré les difficultés rencontrées lors des saponifications du monomère **101** et du dimère **106**, le travail de méthodologie sur l'étape de couplage peptidique nous a permis d'accéder au dimère **106**, au trimère **111** et au tétramère **113** avec des rendements modestes

mais acceptables. Par manque de temps, nous n'avons pas pu poursuivre cette voie mais elle sera approfondie par la suite, notamment afin de déterminer la nature exacte du deuxième composé obtenu lors des saponifications et qui est vraisemblablement à l'origine de la formation du deuxième isomère obtenu lors des couplages peptidiques.

d- Conclusion

Nous avons donc en notre possession deux familles complètes de chaînes pseudopeptidiques fonctionnalisées, du monomère jusqu'à l'hexamère. Nous avons également synthétisé les oligomères de la série oxime jusqu'au tétramère.

Par ailleurs, nous avons envisagé d'inclure dans notre projet des plateformes de type β -peptoïde pour la partie concernant l'élaboration de vaccins anticancéreux. La synthèse originale de ces oligomères β -peptoïdiques a été mise au point au laboratoire.¹⁵⁵

Nous ferons désormais référence à ces différentes familles comme suit (Schéma 49):

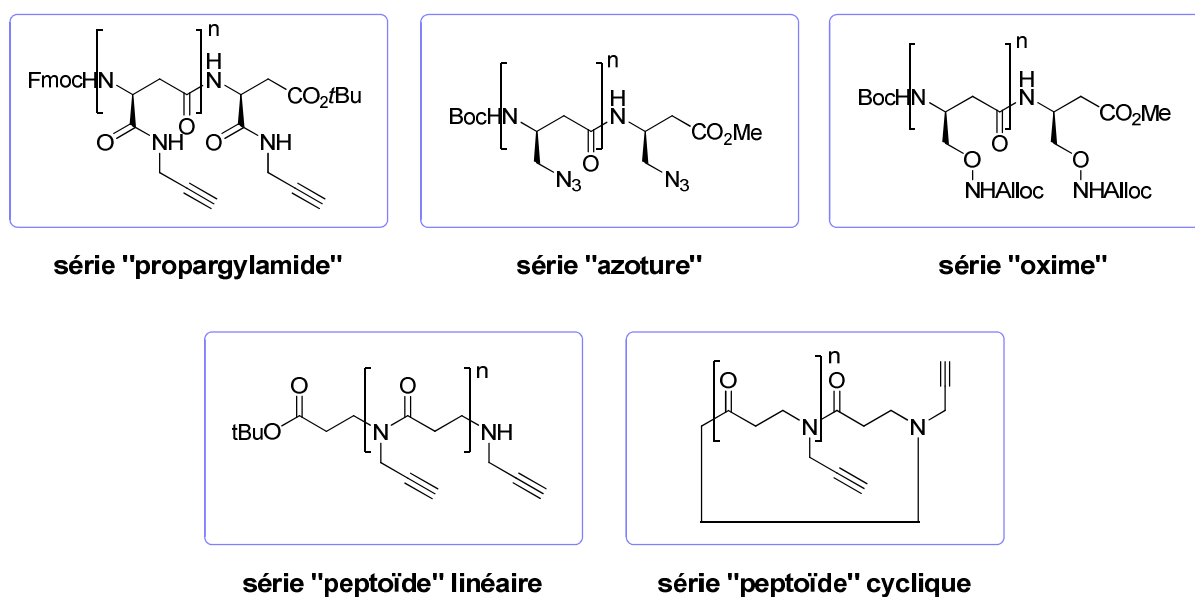


Schéma 49 – Récapitulatif des différentes familles de composés obtenus

II- Synthèse des unités saccharidiques

Parallèlement aux travaux de recherche pour l'obtention des plateformes présentatrices, nous avons synthétisé les unités saccharidiques correctement fonctionnalisées pour être en adéquation avec le type de liaison mis en jeu.

Dans le but d'évaluer le potentiel immunogène de nos composés, il a été nécessaire de synthétiser des édifices glycoconjugués trimériques présentant, d'une part, les épitopes Tn (GalNAc) et, d'autre part, des sucres qui serviront de contrôle lors des tests de reconnaissance antigène/anticorps (ELISA).

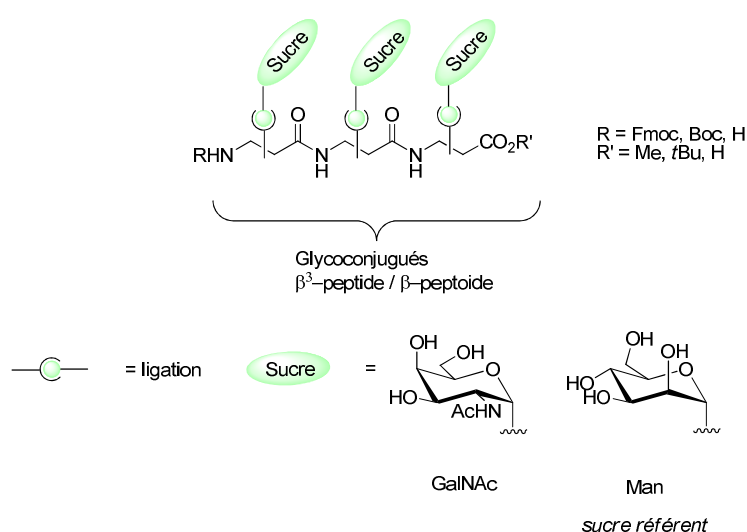


Figure 44 – Structure générale des édifices glycoconjugués à synthétiser

Pour ce faire, nous avons synthétisé des glycosides dérivant du GalNAc pour les épitopes Tn et du D-mannose pour les sucres référents. Ces derniers, le 2'-azidoéthyl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-mannopyranoside¹⁵⁶ **114** et le propargyl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-mannopyranoside¹⁵⁷ **115**, sont décrits dans la littérature. Nous les avons synthétisés au laboratoire en appliquant la méthode des imidates pour l'étape de glycosylation.

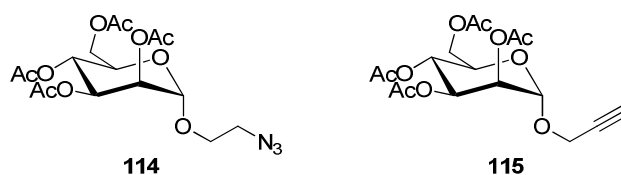


Figure 45 – Sucres référents

Nous ne décrivons donc que la synthèse des deux glycosides dérivés du GalNAc, à savoir le 2'-azidoéthyl-2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-deoxy- α -D-galactopyranoside¹⁵⁸ **116** et le homopropargyl-2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-deoxy- α -D-galactopyranoside **117** (Schéma 50). Ces glycosides peuvent être préparés au départ de α -D-galactosamine, mais, dans notre cas, le prix élevé de ce sucre de départ ne nous aurait pas permis de synthétiser les résidus GalNAc souhaités en grande quantité. Nous avons donc choisi de les synthétiser à partir du D-galactose.

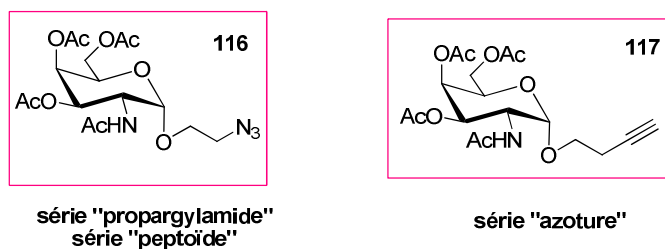


Schéma 50 – Nature des unités saccharidiques à synthétiser

Il nous fallait préparer le bromure de glycoside **121** commun à la synthèse des glycosides **116** et **117**. Sa préparation a été décrite par Lemieux et Ratcliffe¹⁵⁹ en 1979 et a été réutilisée très fréquemment par la suite par de nombreux groupes de recherche. L'étape clé de cette synthèse est l'azidonitration du 3,4,6-tri-*O*-acétyl-D-galactal que nous avons nous-mêmes préparé. Son coût n'est pas rédhibitoire mais notre projet nécessitait des quantités assez importantes. La séquence réactionnelle est décrite sur le Schéma 51.

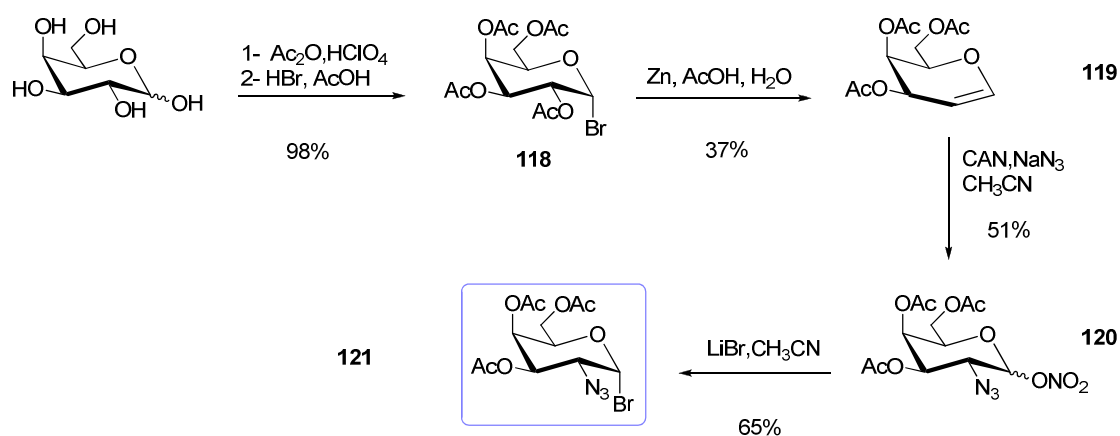


Schéma 51 – Synthèse du dérivé bromé 121

Le D-galactose est tout d'abord peracétylé dans l'anhydride acétique en présence d'acide perchlorique. La position anomérique est ensuite bromée par traitement avec de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique. On obtient le bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-galactopyranosyle¹⁶⁰ **118** avec un rendement brut de 98% qui sera utilisé sans purification. Sa réduction en présence de zinc dans de l'acide acétique aqueux à 50% fournit le 3,4,6-tri-*O*-acétyl-D-galactal **119** avec un rendement de 37%.

Ce dernier réagit ensuite selon une réaction d'azidonitration en présence de nitrate d'ammonium cérique (CAN) et d'azoture de sodium dans l'acétonitrile. Après purification, on obtient le nitrate de 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-déoxy- α/β -D-galactopyranoside **120** sous forme d'un mélange d'anomères (ratio α/β 68:32) avec un rendement de 51%. Lemieux et Ratcliffe¹⁵⁹ rapportent la possible présence d'un composé talo- s'additionnant aux deux anomères. Dans notre cas, la formation de cet isomère n'a pas été observée.

Le mélange d'anomères **120** est ensuite traité par du bromure de lithium dans l'acétonitrile¹⁶¹ pour obtenir le bromure de 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-déoxy- α -D-galactopyranosyle **121** avec un rendement de 65% après purification.

A ce stade, nous avons en notre possession l'intermédiaire commun pour la synthèse des deux types de glycosides.

1- Séries « propargylamide » et « peptoïde »

Le sucre doit présenter sur la partie aglycone la fonction azoture nécessaire pour la ligation de type 1,2,3-triazole.

La glycosylation est réalisée dans les conditions de Koenigs-Knorr¹⁶² sur le bromure de galactopyranosyle **121** par du bromoéthanol, en présence de perchlorate d'argent, de 2,4,6-collidine et de tamis moléculaire 3Å en poudre dans le dichlorométhane (Schéma 52). On obtient le composé **122** avec un rendement très satisfaisant de 88% mais avec une sélectivité moyenne : on obtient un mélange d'anomères α/β (67:33) inséparables.

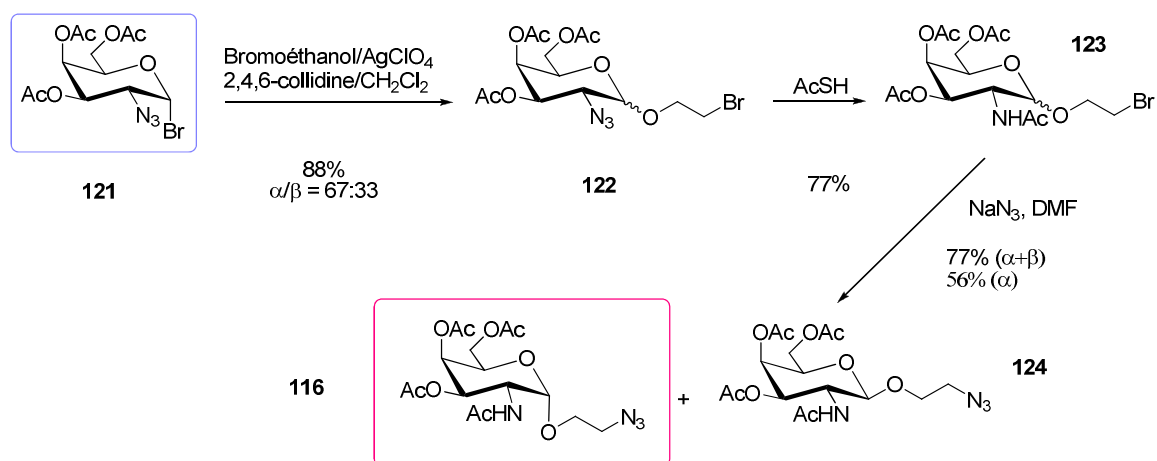


Schéma 52 – Accès au sucre 116 pour les séries « propargylamide » et « peptïde »

Le groupe azoture du glycoside **122** est réduit en acétamide dans l'acide thioacétique¹⁶³ pour donner un mélange d'anomères **123** inséparables avec un rendement de 77%.

La dernière étape consiste en l'introduction du motif azoture par substitution du brome sur les glycosides **123** en présence d'azoture de sodium dans le DMF à 60°C. On obtient alors l'anomère α , soit le résidu GalNAc **116** souhaité, avec un rendement de 56% après avoir purifié le mélange d'anomères par chromatographie sur gel de silice.

2- Série « azoture »

Le sucre doit ici présenter le motif acétylénique nécessaire pour la ligation par chimie « Click ».

La glycosylation est réalisée sur le bromure de galactopyranosyle **121** par du 3-butyn-1-ol, en présence de perchlorate d'argent, de 2,4,6-collidine et de tamis moléculaire 3Å en poudre dans le dichlorométhane¹⁶² (Schéma 53). On obtient le composé **125** avec un rendement très satisfaisant de 81% mais, de nouveau, avec une sélectivité moyenne. Les anomères ($\alpha/\beta = 70:30$) sont inséparables à ce stade de la synthèse.

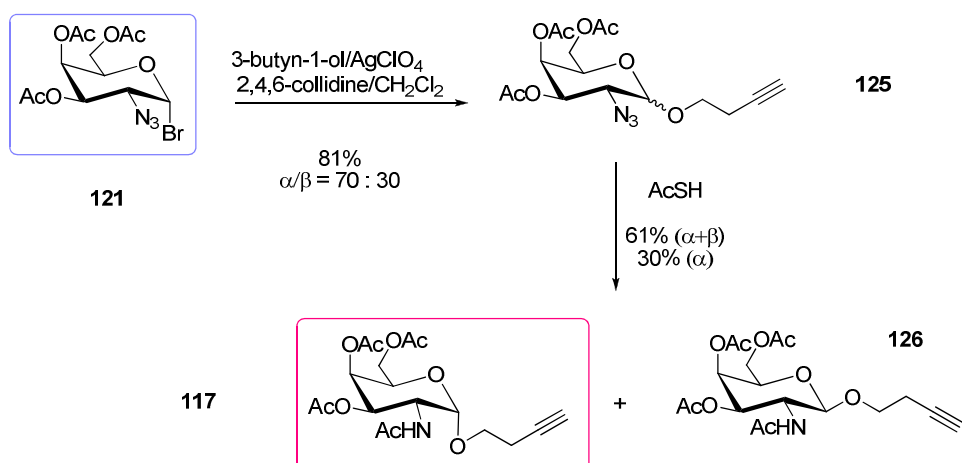


Schéma 53 – Synthèse du sucre 117 pour la série « azoture »

Le groupe azoture des glycosides **125** est réduit en acétamide dans l'acide thioacétique¹⁶³ pour donner le dérivé de *N*-acétylgalactosamine **117** avec un rendement de 30% en anomère α , après purification du mélange d'anomères par chromatographie sur gel de silice.

III- Synthèse des édifices glycoconjugués

1- Etude bibliographique : β -peptides glycosylés

A ce jour, il existe assez peu d'exemples de β -peptides glycosylés. On peut citer les travaux de Arvidsson et Norgren¹⁶⁴ qui ont synthétisé des β^3 -peptides glycosylés par une unité GalNAc sur un résidu homo-sérine différemment positionné sur la chaîne principale. Un exemple est présenté Figure 46.

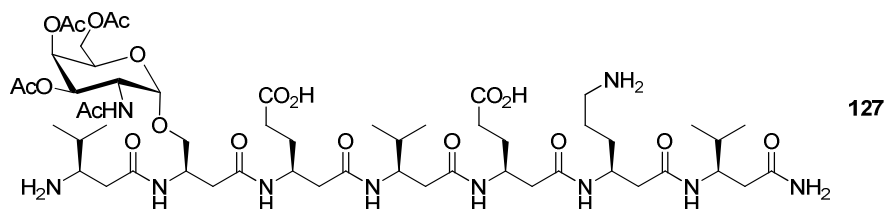


Figure 46 – Exemple de structure β -peptidique *O*-glycosylée

Les auteurs ont montré que ces structures étaient reconnues par quatre lectines (*Glycine max* agglutinin, *Vicia Villosa* agglutinin, *Bandeiraea simplicifolia* agglutinin et *Helix pomatia* agglutinin).¹⁶⁵ Par ailleurs, les propriétés de structuration de ces β -peptides monoglycosylés ont été étudiées et des repliements en hélices H-14 ont été constatés dans tous les cas, quelle que soit la position de l'unité GalNAc sur le squelette peptidique.¹⁶⁶ Mikata et coll. ont préparé et étudié les propriétés de structuration de trimères glycoconjugués de type β^2 -peptidiques dans lesquels les trois unités glucidiques sont liées au squelette par des liaisons carbone-carbone.¹⁶⁷ Le composé RSR **128**, construit par assemblage d'unités glycosylés a montré une structuration stable sous forme d'un pseudocycle à 12 chaînons.

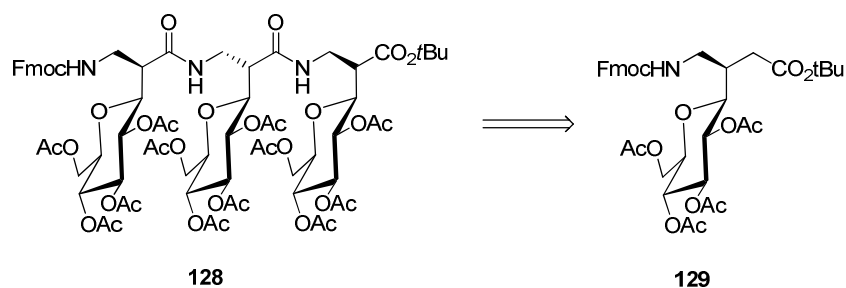


Figure 47 – Exemple de structure β -peptidique C-glycosylée

On peut également citer les travaux de Burger et coll.¹⁶⁸ qui ont synthétisé un β -aminoacide présentant deux unités glucidiques, l'une étant liée au à la chaîne principale par un lien de type urée et l'autre par une liaison *O*-glycosidique (Figure 48).

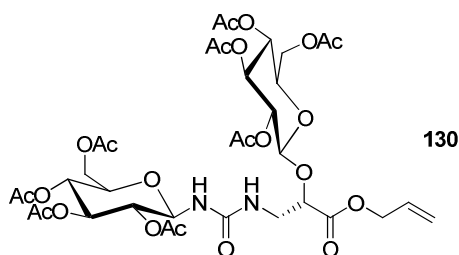


Figure 48 – Exemple de structure β -peptidique *O,N*-glycosylée

Simultanément à nos travaux de recherche, Ziegler et coll.¹³⁵ ont décrit la synthèse de building blocks glycosylés dérivant de l'acide (L)-aspartique (Figure 49). A ce jour, les auteurs n'ont pas publié d'oligomères construits à partir de ces unités.

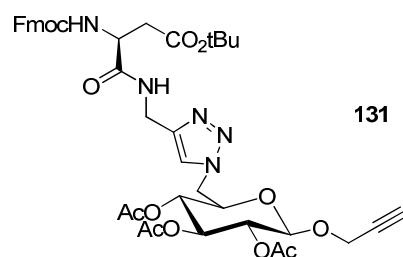


Figure 49 – Exemple de monomère glycosylé par liaison de type 1,2,3-triazole

On trouve également des exemples d'oligomères constitués de β -aminoacides hétérocycliques présentant plusieurs unités saccharidiques. Ainsi, Gallagher et coll.¹⁶⁹ ont synthétisé un hexamère dérivant de l'acide *trans*-3-aminopyrrolidine-4-carboxylique et de *trans*-ACPC utilisé ici comme espaceur. Se basant sur les travaux de Gellman,¹⁷⁰ les auteurs ont montré que l'introduction stratégiques d'unités β -Galactose sur les résidus $i + 1$, $i + 2$ et $i + 4$ par un lien de type sulfonamide n'altérerait pas la structuration en hélice H-12 adoptée par l'oligomère.

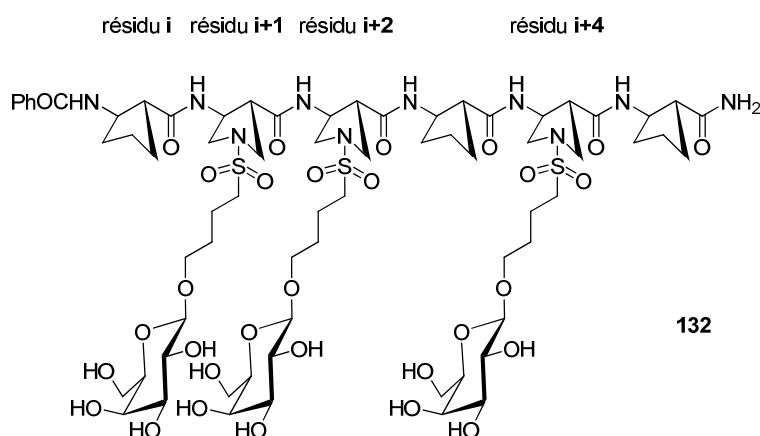


Figure 50 – Exemple de β -peptide glycosylé par un lien sulfonamide

Enfin, on peut citer un exemple de β -peptide cyclique par Lönnberg et coll. obtenu par SPPS (Figure 51). Ce tétramère cyclique β^2 -peptidique joue le rôle de *scaffold* et présente trois unités saccharidiques liées au squelette par une liaison de type amide.¹⁷¹

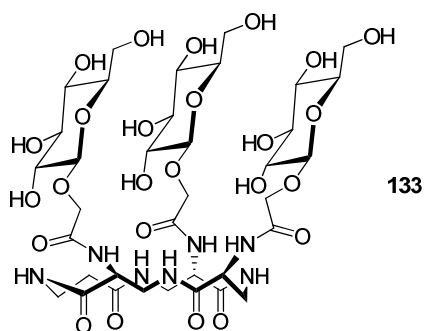


Figure 51 – Exemple de β -peptide cyclique glycosylé

2- Ligation de type 1,2,3-triazole

a- Rappels bibliographiques : Cycloaddition 1,3-dipolaire – Conditions expérimentales

Les cycles 1,2,3-triazoles peuvent être formés par cycloaddition 1,3 dipolaire (réaction de Huisgen)¹⁷² entre un azoture et un alcyne.

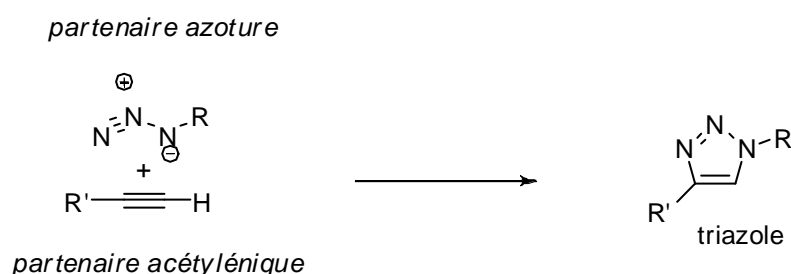


Schéma 54 – Cycloaddition 1,3 dipolaire

Les alcynes et les azotures sont facilement introduits sur une molécule et sont relativement stables sous une grande variété de conditions. Ils sont en particulier inertes dans la plupart des conditions biologiques et organiques et en présence d'oxygène moléculaire et d'eau. Mais cette grande stabilité est à l'origine de la faible vitesse avec laquelle les réactions de cycloaddition 1,3 dipolaire ont lieu. Ceci impose de mener ces réactions sous certaines conditions de chauffage ou avec des temps de réaction très longs. Cependant, les réactions de Huisgen menées à chaud conduisent de façon générale à un mélange de 1,4- et 1,5-régioisomères, sauf dans le cas du couplage entre un azoture et un alcyne terminal pauvre en électrons.¹⁷³

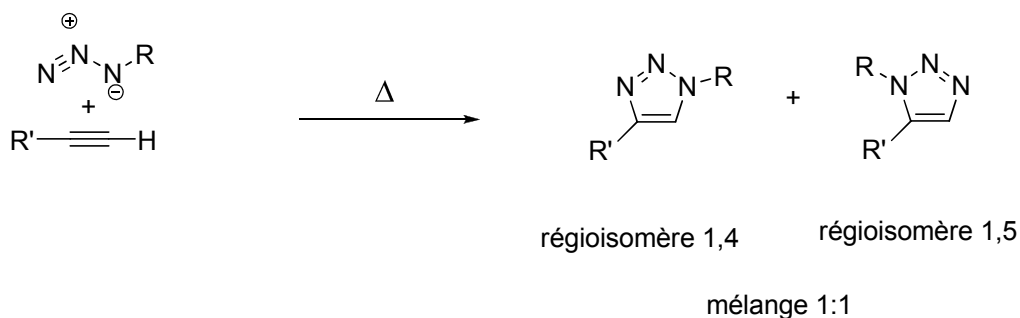


Schéma 55 – Cycloaddition 1,3-dipolaire thermique

De manière indépendante, les groupes de Sharpless¹⁷⁴ et de Meldal¹⁷⁵ ont montré que l'utilisation de Cu^(I) conduisait exclusivement au régioisomère 1,4 et diminuait le temps de réaction de 10⁷ fois, permettant ainsi de s'affranchir totalement de la nécessité d'une élévation de température. Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire ainsi réalisées rentrent parfaitement dans le cadre de la « Click Chemistry ».

La « Click Chemistry » est un concept défini pour la première fois par Sharpless.¹⁷⁶ Il se base sur différents critères qu'une réaction doit remplir afin de pouvoir être qualifiée de « Click Chemistry ». Les critères énoncés par Sharpless sont les suivants :

- la réaction doit être modulaire (mettant en jeu des « blocs » à assembler),
- la réaction doit présenter un large champ d'application,
- les rendements doivent être très élevés,
- les sous-produits générés doivent être « inoffensifs » et doivent pouvoir être éliminés par des méthodes non chromatographiques,
- la réaction doit être stéréospécifique (mais pas nécessairement énantiosélective).

Ces caractéristiques incluent par ailleurs :

- des conditions de réaction simples (idéalement insensibles à l'oxygène et à l'eau),
- des matériels de départ et des réactifs facilement accessibles,
- l'absence de solvant ou l'utilisation d'un solvant non toxique (tel que l'eau) ou facilement éliminable,
- un processus d'isolement du produit formé qui soit simple (cristallisation, distillation, méthodes non chromatographiques).

Il existe un grand nombre de réactions de formation de liaison carbone-hétéroatome qui peuvent entrer dans le cadre de la « Click Chemistry », comme par exemple :

- cycloadditions d'espèces insaturées : cycloaddition 1,3-dipolaire, réaction de Diels-Alder,
- chimie des substitutions nucléophiles, réaction d'ouverture électrophiles d'hétérocycles contraints tels que les époxydes, les aziridines, les ions aziridinium, et les ions épisulfoniums,
- chimie des carbonyles de type « non-aldol », tels que la formation d'urées, de thiourées, d'hétérocycles aromatiques, d'oxime éthers, d'hydrazones et d'amides,
- additions sur des liaisons carbone-carbone insaturées, telles que les époxidations, les dihydroxylations ou les additions de Michael.

Les réactions de cycloadditions 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azoture catalysées au $\text{Cu}^{(I)}$ peuvent très bien remplir ces critères. Sharpless et coll. ont proposé un mécanisme¹⁷⁴ mais d'autres mécanismes ont par la suite été envisagés. Le cycle catalytique proposé est le suivant :

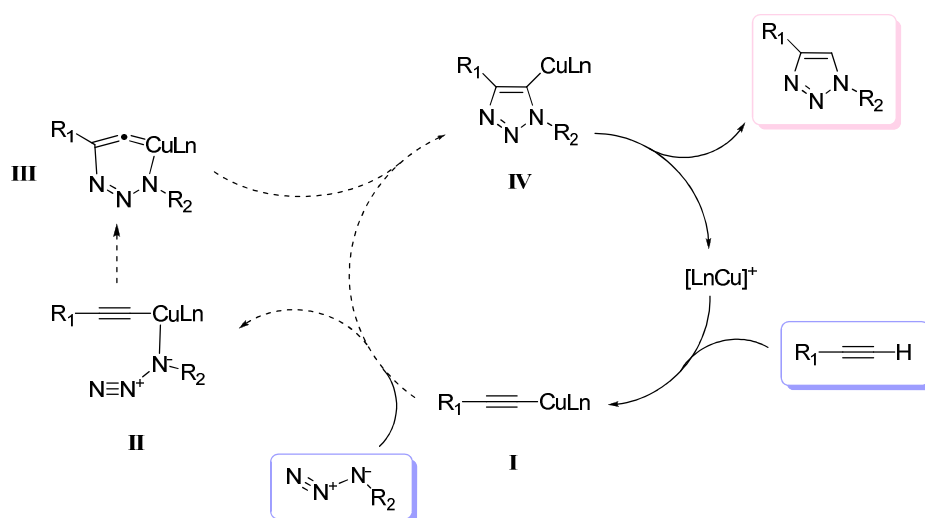


Schéma 56 – Proposition de mécanisme de cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée au $\text{Cu}^{(I)}$

La première étape consiste en l'insertion du cuivre dans la liaison $\equiv\text{C-H}$ pour donner l'intermédiaire **I**. Des calculs théoriques semblent écarter l'hypothèse d'une cycloaddition concertée [2+3] qui serait de trop haute énergie et laissent envisager une voie passant par un composé intermédiaire **II** aboutissant à la formation de l'hétérocycle à six chaînons intermédiaire **III** dont le réarrangement fournirait le cycle 1,2,3-triazole **IV**. La régénération de l'espèce $[\text{CuLn}]^+$ permettrait au final l'obtention du composé attendu.

L'espèce $\text{Cu}^{(I)}$ peut être introduite directement sous forme de sels (CuI , CuBr , $\text{CuOTf.C}_6\text{H}_6\dots$) mais elle peut également être introduite sous forme de sels de $\text{Cu}^{(II)}$, tels que $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, en présence d'un réducteur, comme l'acide ascorbique ou l'ascorbate de sodium.

Ce sont ces dernières conditions que nous allons mettre en œuvre. Le cuivre $\text{Cu}^{(II)}$ est utilisé sous forme d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre CuSO_4 de concentration 0,1M. L'acide ascorbique est utilisé sous forme d'une solution aqueuse de concentration 0,1M toujours fraîchement préparée et stockée à l'abri de la lumière.

De manière générale, nous emploierons 1 équivalent de sucre par partenaire : ainsi, un tétramère présentant quatre motifs acétyléniques sera traité avec quatre équivalents de sucre.

Les sucres **134** et **135** sont des sucres « modèles » que nous avons utilisés pour la mise au point des réactions de CuAAC.

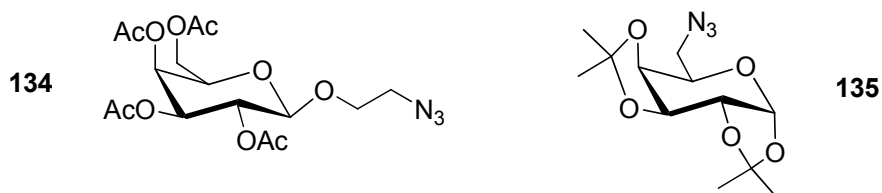


Figure 52 – Sucres « modèles » utilisés pour la mise au point des conditions réactionnelles pour la CuAAC

Le sucre **114**, dérivé du D-mannose, sera un sucre « référent » utilisé pour la synthèse des édifices glycoconjugués qui serviront de référence pour les tests biologiques envisagés.

b- Série « propargylamide »

(a) Mise au point des conditions réactionnelles

A l'issue de nos travaux portant sur la synthèse des plateformes β -peptidiques, nous sommes en possession d'un certain nombre d'oligomères provenant de différentes sources. Nous avons des composés issus de la série Boc/OMe obtenus par application de la voie alternative décrite précédemment ainsi que les oligomères de la série Fmoc/OtBu (Figure 53).

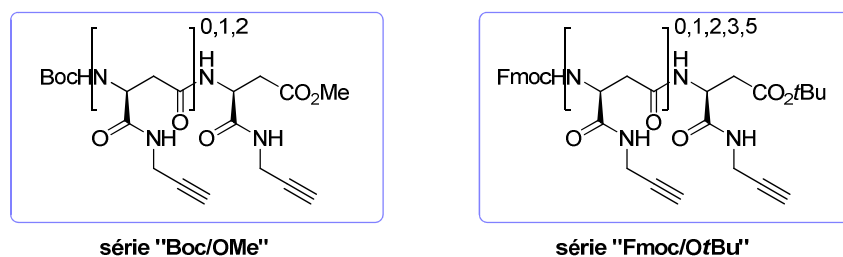


Figure 53 – Plateformes β -peptidiques de la série « propargylamide »

Ceci nous a permis d'accéder à un certain nombre de composés glycoconjugués en mettant en œuvre des réactions de CuAAC où les plateformes présentent ici le partenaire alcyne « $-C\equiv CH$ ».

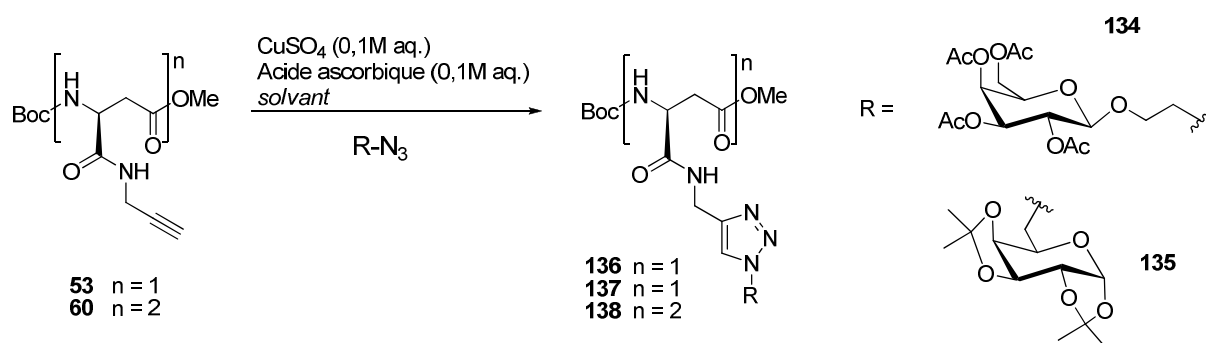


Schéma 57 - Réaction de CuAAC

La mise au point des conditions réactionnelles dans cette série a débuté sur le monomère **53**, en utilisant comme partenaire « azote » les dérivés du D-galactose **134** et **135** qui ont été synthétisés au laboratoire à partir de protocoles décrits.^{177,178} Les meilleures conditions ont ensuite été étendues au dimère **60**.

Oligomère	Sucre	CuSO ₄ .H ₂ O (0,1M aq.)	Acide ascorbique (0,1M aq.)	Solvant	Composé glycoconjugué	Rdt ^a
Monomère 53	134	0,08 éq.	0,24 éq.	<i>t</i> BuOH/ H ₂ O 1:1	136	53%
Monomère 53	135	0,08 éq.	0,24 éq.	DMF	137	88%
Dimère 60	135	0,16 éq.	0,48 éq.	DMF	138	65%

^a : rendement après purification

Tableau 7 – Conditions testées pour la réaction de CuAAC

Le monomère **53** est traité par 1,0 équivalent de sucre **134** dans un mélange *t*BuOH/H₂O 1:1 dans les conditions de CuAAC décrites dans le Tableau 7. Le composé glycoconjugué **136** est obtenu avec un rendement de 53% et une excellente pureté (HPLC > 99%).

Sachant que les oligomères plus longs de cette série ne sont plus solubles dans le mélange *t*BuOH/H₂O 1:1, nous avons testé la réaction de CuAAC dans le DMF.^{179,173} Nous avons testé la réaction dans le DMF avec le 6-azido-D-galactopyranoside **135**. Dans les conditions décrites précédemment, le composé **137** est obtenu avec un rendement de 88% et une très bonne pureté (HPLC = 94%).

Nous avons ensuite testé les conditions de réaction sur le dimère **60** avec le même sucre modèle **135**. Après 20h de réaction, le suivi de la réaction montrait toujours des traces de matériel de départ. Les quantités de cuivre et d'acide ascorbique ont donc été doublées pour atteindre respectivement 0,16 et 0,48 équivalents. Après purification par chromatographie sur gel de silice, le dimère glycoconjugué **138** est obtenu avec un rendement de 65% et une excellente pureté (HPLC > 99%).

Il est à noter que le composé **138** ne présente pas de problème de solubilité contrairement au dimère non conjugué **60**. L'introduction des unités saccharidiques devrait donc améliorer nettement la solubilité des composés.

(b) Synthèse des composés glycoconjugués

Ayant mis au point les conditions de CuAAC les plus adaptées à nos composés, nous les avons appliquées à la synthèse des glycoconjugués d'oligomères issus de la série Boc/OMe et Fmoc/O*t*Bu.

❖ Série Boc/OMe

Dans cette série, nous disposons des monomère, dimère et trimère, ce dernier ne présentant une pureté moyenne en raison des problèmes de purification liés à son manque de solubilité. Les problèmes de purifications ont été résolus ultérieurement en série Fmoc/O*t*Bu.

Nous avons donc appliqué les conditions de CuAAC précédemment décrites sur le dimère et le trimère avec le résidu GalNAc **116**.

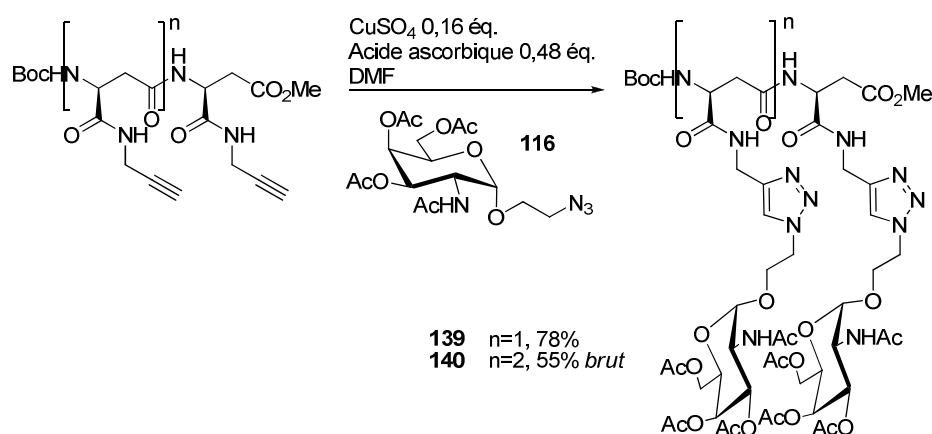


Schéma 58 – Greffage des unités saccharidiques sur le dimère 60 et le trimère 62

Le composé **139** a été obtenu avec un rendement de 78% après purification. Dans le cas du trimère **140**, la réaction a été effectuée sur une très petite quantité, ce qui ne nous a pas permis de le purifier. Mais sa formation a été attestée lors du suivi de la réaction par CCM qui montrait la présence d'un unique produit et le pic moléculaire a bien été observé par HR-MS.

❖ Série Fmoc/OtBu

Cette série est complète : nous disposons des oligomères « propargylamide », du monomère jusqu'à l'hexamère. Nous avons donc appliqué les conditions de CuAAC précédemment décrites sur chacun d'entre eux avec le dérivé du D-mannose **114** comme partenaire « azoture ».

Il est apparu que les conditions précédemment utilisées et appliquées ici au monomère **67**, à savoir 0,16 équivalent de CuSO_4 et 0,48 équivalent d'acide ascorbique, n'ont pas permis une conversion totale de ce dernier. En effet, après 24h de réaction, on observe bien la formation d'un unique composé mais il reste une grande quantité de monomère **67**.

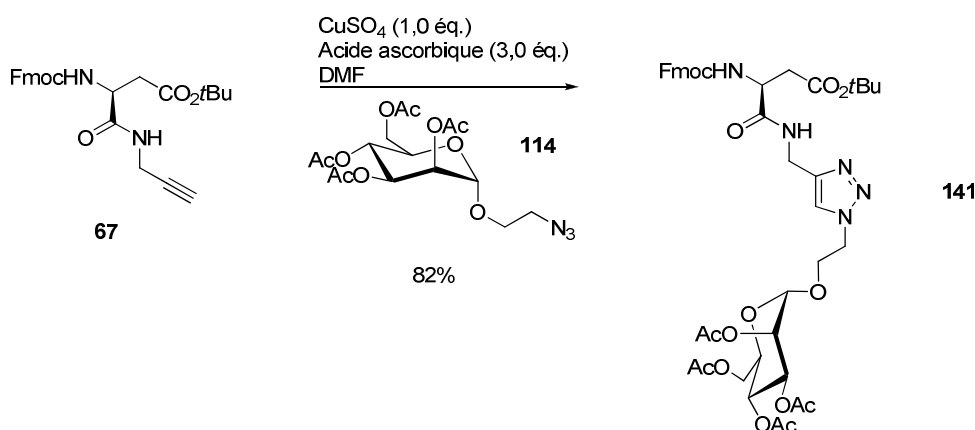


Schéma 59 – Accès au composé 141

Les quantités de cuivre et d'acide ascorbique ont donc été progressivement augmentées par tranches respectives de 0,08 équivalent et 0,24 équivalent. Finalement, en utilisant 1,0 équivalent de cuivre et 3,0 équivalents d'acide ascorbique, on obtient le monomère glycoconjugué **141** avec un rendement de 82% et une excellente pureté (HPLC = 96%). La modification des groupements protecteurs a manifestement eu un effet significatif sur les conditions de cette réaction. Dans cette topologie, le monomère **67** doit être un bon ligand du cuivre, ce qui explique sans doute qu'on ait été obligé d'augmenter les quantités de cuivre dans de telles proportions. Ce comportement a été observé pour le reste de la série jusqu'au tétramère. Les glycoconjugués sont tous obtenus en utilisant 1,0 équivalent de cuivre et 3,0 équivalents d'acide ascorbique dans le DMF. Le nombre d'équivalents de cuivre est rapporté à la quantité d'oligomère de départ. Ainsi, on constate que la quantité de cuivre nécessaire par résidu diminue avec l'allongement de la chaîne. Par exemple, pour le tétramère **144**, 1 équivalent de cuivre correspond à 0,25 équivalent par résidu. Ceci met en évidence le caractère auto-catalytique de la réaction. Les puretés des composés obtenus après chromatographie flash sont très satisfaisantes (HPLC > 96%).

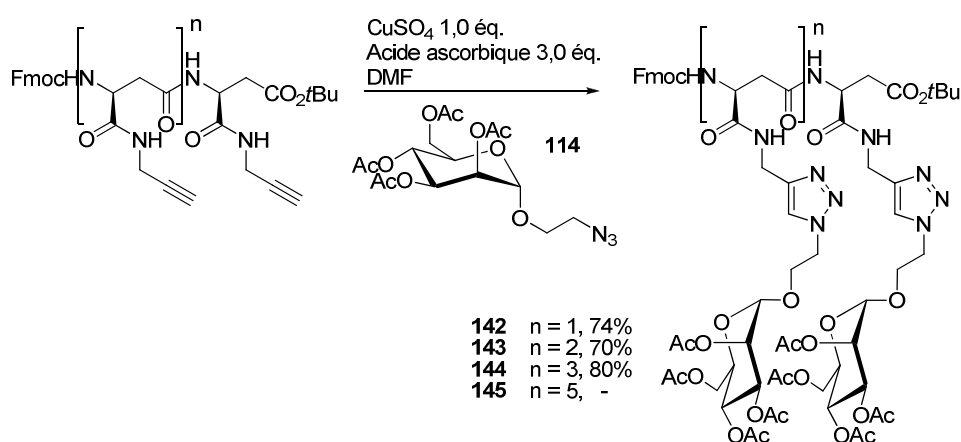


Schéma 60 – Synthèse des édifices glycoconjugués 142, 143, 144 et 145

A ce jour, nous n'avons pas réussi à obtenir l'hexamère glycoconjugué **145**. En effet, l'hexamère **76** présente une telle insolubilité dans le DMF qu'il est impossible de suivre l'évolution de la réaction que ce soit par CCM ou par HPLC.

Dans le cadre du projet « Immunothérapie anticancéreuse », nous avons synthétisé le trimère glycoconjugué **146** qui sera par la suite utilisé pour un test de reconnaissance antigène-anticorps. Il est obtenu avec un rendement de 73% et une pureté HPLC de 85%.

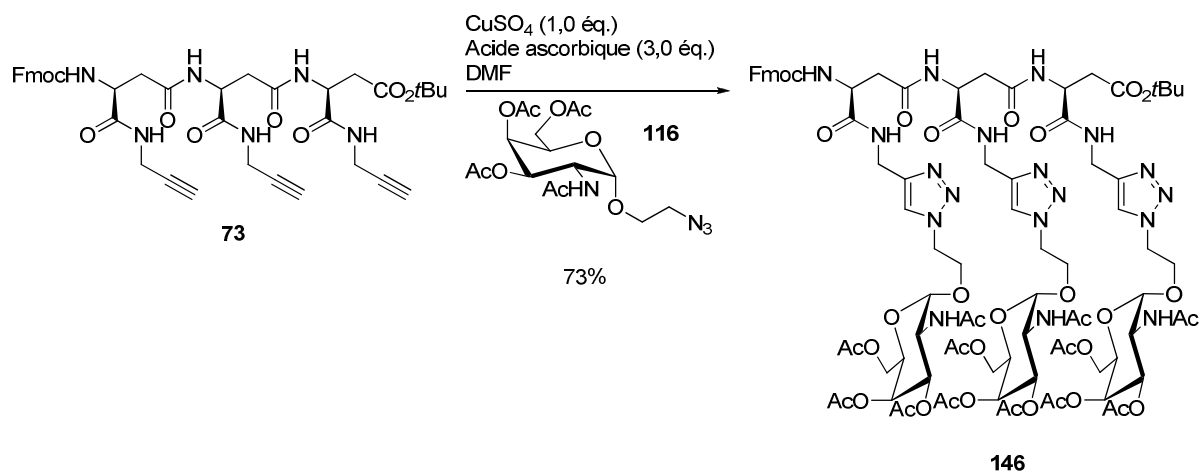


Schéma 61 – Synthèse du glycoconjugué 146

(c) Optimisation des conditions de réaction

Les réactions de CuAAC menées sur les oligomères de la série « propargylamide » Fmoc/*Ot*Bu ne peuvent plus être considérées comme catalysées au cuivre puisqu'il a été nécessaire d'en utiliser 1,0 équivalent. Nous avons donc décidé d'effectuer une courte étude méthodologique afin d'optimiser ces conditions de réaction. Nous avons testé différentes sources de cuivre et différentes conditions réactionnelles, résumées dans le Tableau 8.

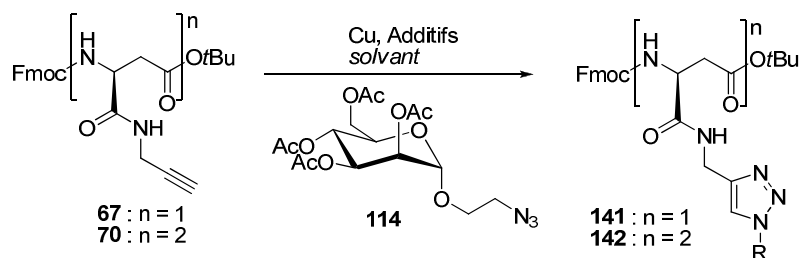


Schéma 62 – Réaction de CuAAC

Essai	Oligomère	Source de Cu ^(I)	Additif	Solvant	Conditions	Composé glycoconjugué	Rdt ^b
1	Dimère 70	CuSO ₄ .5H ₂ O (0,32 éq.)	Acide ascorbique (0,96 éq.)	DMF	Micro-ondes ^a (85 min)	142	73%
2	Dimère 70	CuI (0,1 éq.)	DIPEA (1,0 éq.)	DMF	TA	-	-
3	Monomère 67	CuIP(OEt) ₃ (0,1 éq.)	DIPEA (2,0 éq.)	Toluène	Micro-ondes ^a (30 min)	141	95%
4	Dimère 70	CuIP(OEt) ₃ (0,1 éq.)	DIPEA (2,0 éq.)	Toluène	Micro-ondes ^a (30 min)	142	traces
5	Dimère 70	CuIP(OEt) ₃ (0,1 éq.)	DIPEA (2,0 éq.)	DMF	Micro-ondes ^a (30 min)	142	35%

^a Les réactions sous micro-ondes sont menées à 85°C, sous une puissance de 50W – ^b Rendement en composé glycoconjugué après purification par chromatographie flash.

Tableau 8 – Conditions testées pour la réaction de CuAAC

La littérature rapporte que l'utilisation des micro-ondes pour les réactions de CuAAC peut souvent améliorer les conditions de réactions (temps, quantité de cuivre, rendements...). Il nous est donc apparu comme évident d'essayer d'appliquer cette méthodologie à la synthèse de nos composés afin d'essayer de rétablir le caractère catalytique de la réaction de CuAAC. Le dimère **70** a ainsi été traité en présence de 2,0 équivalents de sucre **114** dans le DMF¹⁷³ selon les conditions décrites décrite pour l'essai **1** (Tableau 8). Le dimère glycoconjugué **142** est obtenu avec un rendement de 73% et l'utilisation des micro-ondes a permis de diviser par trois la quantité de cuivre, ce qui est relativement satisfaisant : cela correspond à 0,16 équivalent de cuivre par partenaire « alcyne », quantité que l'on peut qualifier de catalytique.

Par ailleurs, il est possible d'introduire le cuivre sous sa forme Cu^(I), ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'un agent réducteur comme l'acide ascorbique. Ainsi, le dimère **70** a été traité par 2,0 équivalents de sucre **114** dans le DMF¹⁷³ dans les conditions décrites dans le Tableau 8 (essai **2**). Après 18h de réaction, aucune trace de composé **142** attendu n'a été observée. Les quantités de CuI et de DIPEA ont donc été augmentées mais sans résultat. La coloration bleu-vert du milieu, signe de la présence de la forme oxydée Cu^(II), a mis en évidence l'absence de Cu^(I) nécessaire à la réaction de CuAAC.

Nous avons ensuite testé le $\text{CuIP}(\text{OEt})_3^{180}$ comme source de $\text{Cu}^{(I)}$, préparé au laboratoire. Le monomère **67** est traité par 1,0 équivalent de sucre **114** dans le toluène dans les conditions décrites Tableau 8 (essai **3**). Il est obtenu avec un excellent rendement. Malheureusement, ces mêmes conditions appliquées au dimère **70** n'ont pas fourni le composé souhaité, seules des traces ont été détectées lors du suivi de la réaction par CCM. Pensant que l'origine du problème résidait dans la faible solubilité du dimère **70** dans le toluène, nous avons appliqué des conditions identiques en changeant la nature du solvant : le toluène a été remplacé par le DMF (essai **4** – Tableau 8). Dans ces conditions, le dimère glycoconjugué **142** est obtenu avec un rendement modeste. Il semblerait que l'utilisation de $\text{CuIP}(\text{OEt})_3$ comme catalyseur de la réaction de CuAAC ne soit pas adapté dans notre cas.

(d) Désacétylation des unités saccharidiques

La désacétylation de l'unité saccharidique sur le monomère **141** est effectuée dans les conditions de désacétylation de Zemplén en présence de MeONa dans le méthanol anhydre (Na/MeOH). Malheureusement, le suivi de la réaction par CCM met en évidence la formation de trois composés.

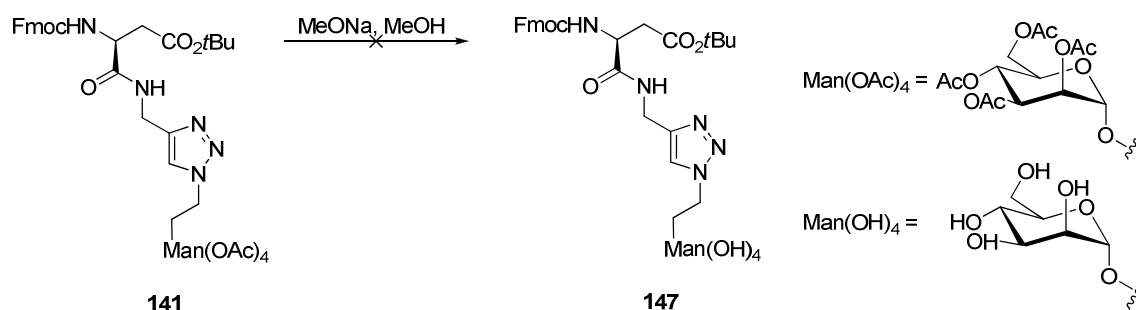


Schéma 63 – Essai de désacétylation du composé 141

Des expériences complémentaires (Schéma 64 et Schéma 65) nous ont permis de déterminer l'origine de ces trois composés. La désacétylation des sucres a successivement été tentée sur l'acide **148** et sur l'amine **151**, obtenus respectivement par traitement du monomère **141** en présence de TFA dans le dichlorométhane ou en présence de diéthylamine dans l'acétonitrile.

L'acide **148** a été soumis aux conditions de désacétylation en présence de MeONa dans le méthanol. Le suivi par CCM de la réaction a montré la formation de deux composés. L'étude par LC-MS du mélange obtenu a révélé la présence de deux produits désacétylés, dont un ne porte plus de groupement Fmoc. Ce dernier n'étant donc pas aussi stable que prévu

est éliminé en partie, ce qui représente un obstacle à la désacétylation des unités saccharidiques. La littérature rapporte des exemples où, dans de telles conditions, le groupement Fmoc est en partie éliminé, avec des conséquences non négligeables sur le rendement de la réaction.¹⁸¹

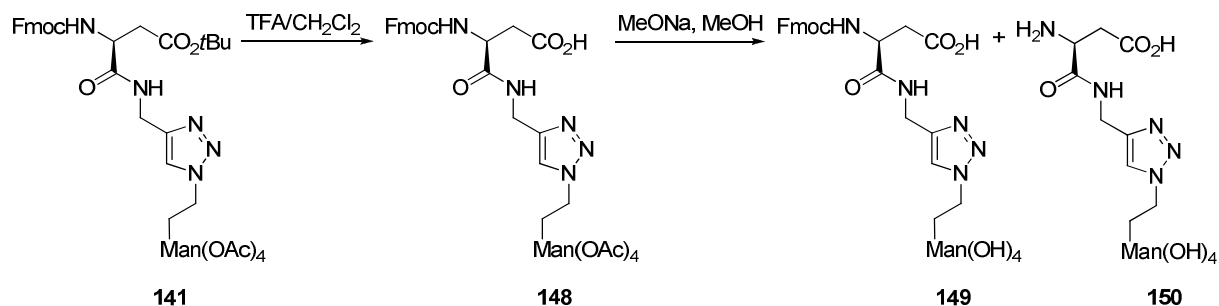


Schéma 64 – Essai de désacétylation du composé 148

La désacétylation a ensuite été testée sur l'amine **151**, obtenue au départ du monomère **141** avec un rendement de 97% après purification par flash chromatographie. Le traitement de cette dernière par du MeONa dans le méthanol conduit également à un mélange de deux composés identifiés par LC-MS. Le composé majoritaire **152** est le produit de désacétylation attendu et le second est l'aspartimide **153**.

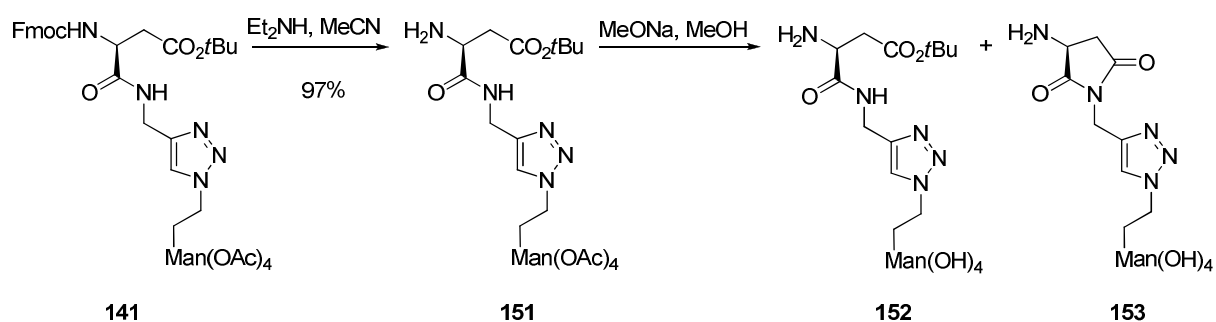


Schéma 65 – Essai de désacétylation du composé 151

L'alternative envisagée a été la déprotection totale du composé **141** afin de procéder ensuite à la désacétylation. L'amine libre **151** est donc traitée par de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour donner quantitativement l'acide correspondant. Ce dernier est alors soumis à un traitement par du MeONa dans le méthanol pour donner quantitativement le composé déprotégé **150**.

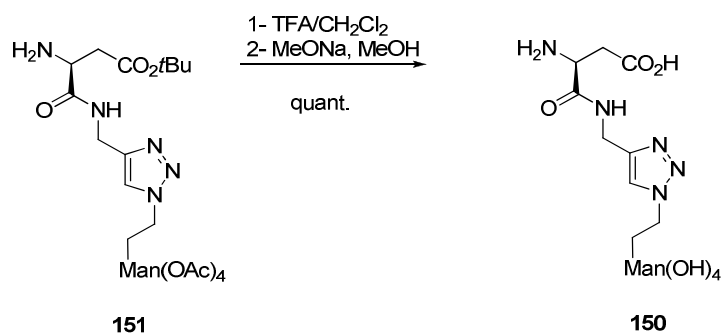


Schéma 66 – Désacétylation du composé 151

Ce procédé a donc été appliqué avec succès à l'ensemble de la série :

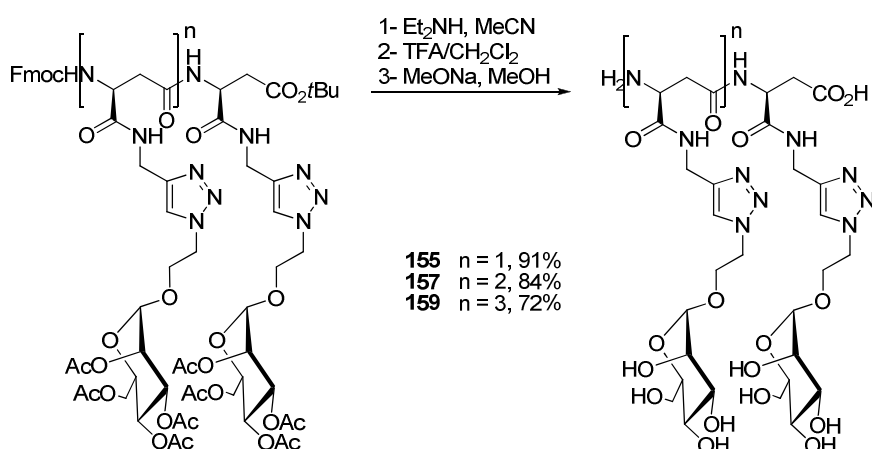


Schéma 67 – Désacétylation de l'ensemble des édifices glycoconjugués de la série « propargylamide »

Nous avons donc obtenu l'ensemble des composés glycoconjugués présentant les unités saccharidiques désacétylées avec de bons rendements.

c- Série « peptoïde »

La synthèse des oligomères linéaires et cycliques de la série « peptoïde » ayant été mise au point au laboratoire,¹⁵⁵ il a rapidement été possible d'utiliser ces structures pour la synthèse d'édifices glycoconjugués mettant en œuvre des réactions de CuAAC. Les oligomères ont été conjugués à deux sucres différents : le dérivé du D-mannose **114** et le dérivé de GalNAc **124**.

Le trimère de la série « peptoïde » **160** a ainsi été mis en présence de sucre **114** et traité par 0,16 équivalent de Cu^(II) et 0,48 équivalent d'acide ascorbique dans le DMF. Le glycoconjugué **161** est isolé avec un rendement de 63%.

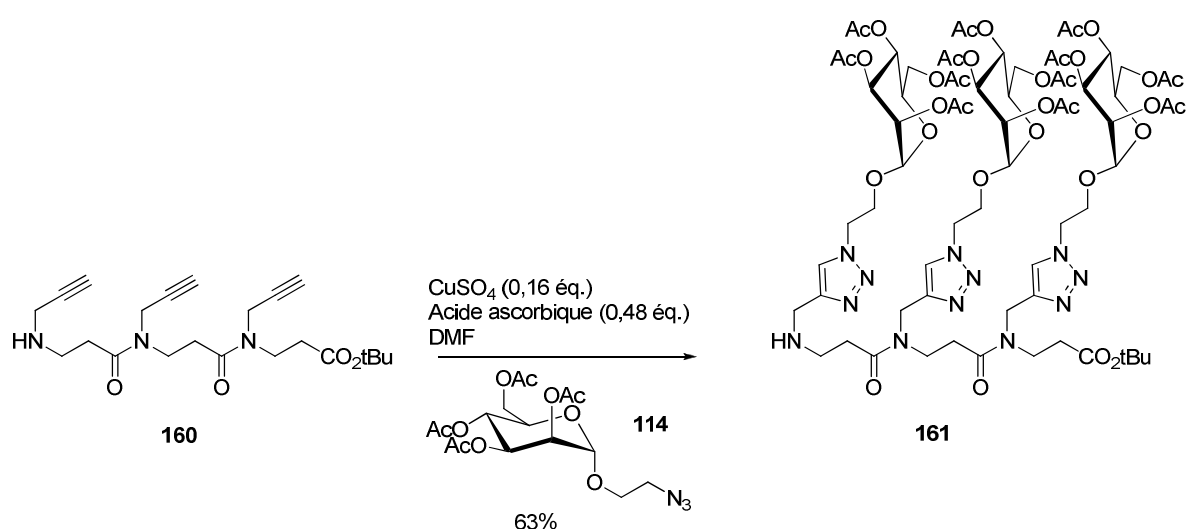


Schéma 68 – Synthèse du composé 161

Aucun problème ne s'est posé au cours de la réaction de CuAAC, notamment en matière de quantité de cuivre Cu^{II} introduite : la réaction peut être considérée comme catalytique.

La cycloaddition 1,3-dipolaire entre le térapeptide **162**, acétylé à l'extrémité *N*-terminale, et du GalNAc **124** a pu être effectuée avec 0,16 équivalent de Cu^{II} et de 0,64 équivalent d'acide ascorbique dans le DMF. Le glycoconjugué **163** est obtenu avec un rendement de 74%.

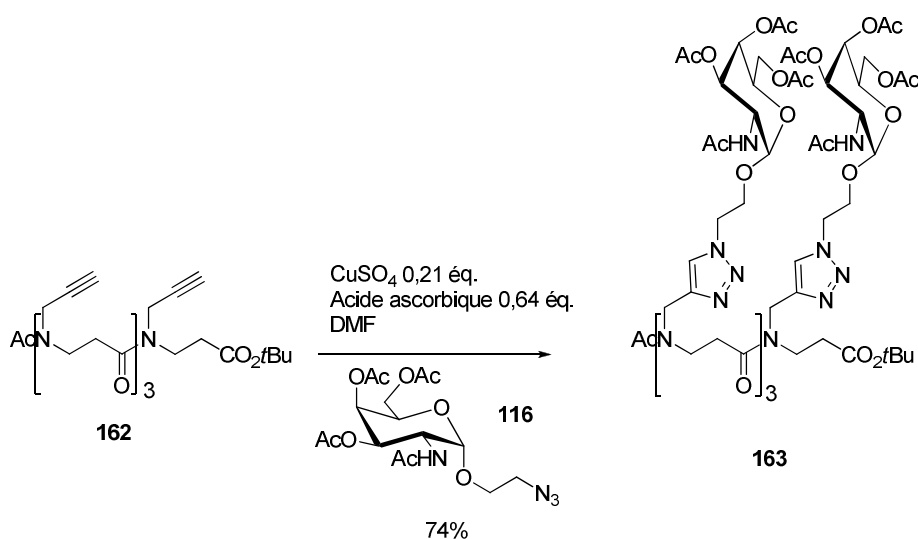


Schéma 69 – Synthèse du composé 163

Nous avons également réalisé les cycloadditions sur des peptoides cycliques. Le tétramère **164** et le pentamère **165** cycliques ont été mis en présence respectivement de 4 et 5

équivalents de GalNAc **116** et traités avec 0,16 équivalent de Cu^(II) et 0,48 équivalent d'acide ascorbique dans le DMF. Les glycoconjugués **166** et **167** avec des rendements respectifs de 51% et 55% après purification. Les puretés de ces composés sont très satisfaisantes (HPLC > 99%).

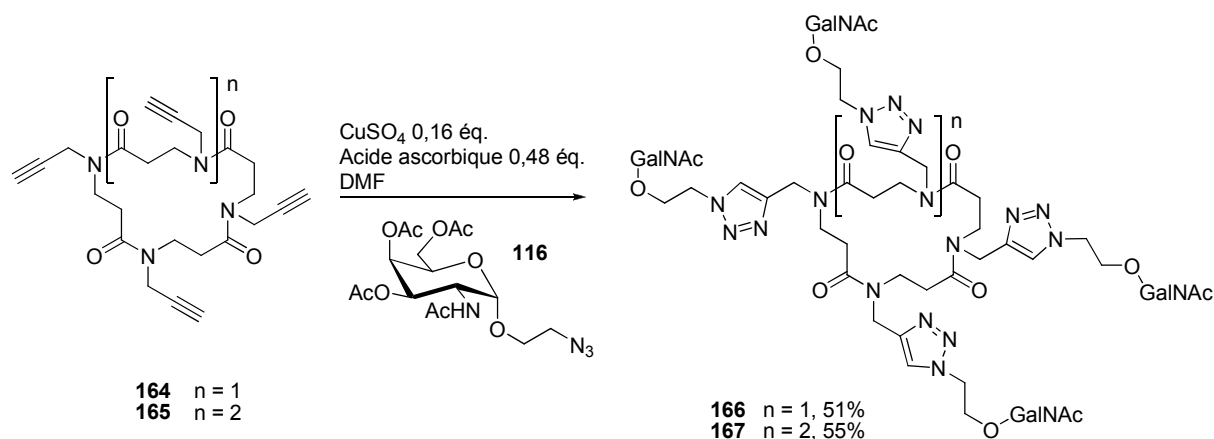


Schéma 70 – Synthèse des peptoides cycliques glycoconjugués 166 et 167

d- Série « azoture »

Dans le cas de cette série, les plateformes β -peptidiques présentent le partenaire « azoture » nécessaire à la réaction de CuAAC.

Les oligomères **85**, **88**, **91**, **92** et **94** sont traités en présence de la quantité adéquate de sucre **115**, de 0,16 équivalent de Cu^(II) et 0,48 équivalent d'acide ascorbique dans le DMF. Les oligomères glycoconjugués **168**, **169**, **170**, **171** et **172** sont obtenus après purification par chromatographie flash avec des rendements très satisfaisants. Il est intéressant de noter que ces rendements restent constants et élevés : ils ne diminuent pas avec l'allongement de la chaîne. Dans le cas de la série « azoture », aucun problème ne s'est posé lors des réactions de CuAAC, en ce qui concerne la quantité de cuivre Cu^(II) utilisée. Les puretés des composés obtenus sont très satisfaisantes (pureté HPLC > 99%). Les unités saccharidiques sont déprotégées sans problème en présence de Na/MeOH. On obtient les composés déprotégés **173**, **174**, **175**, **176** et **177** avec d'excellents rendements et d'excellentes puretés (pureté HPLC > 99%).

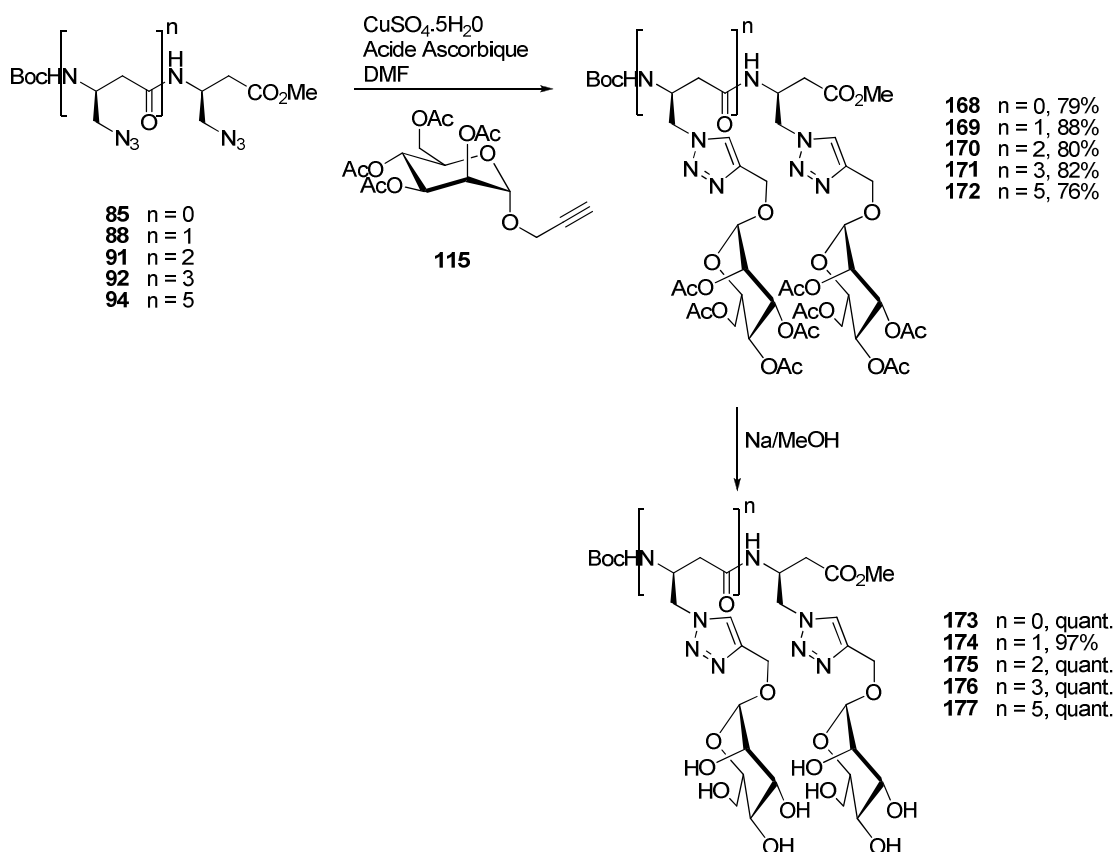


Schéma 71 – Accès aux glycoconjugués 173, 174, 175, 176 et 177

Dans le cadre du projet « Immunothérapie anticancéreuse », nous avons synthétisé le trimère glycoconjugué **178**. Le trimère **91** est mis en présence du sucre **117** (GalNAc) et traité par 0,16 équivalent de Cu^{II} et 0,48 équivalent d'acide ascorbique dans le DMF pour fournir le glycoconjugué **178** avec un bon rendement et une excellente pureté (HPLC > 99%).

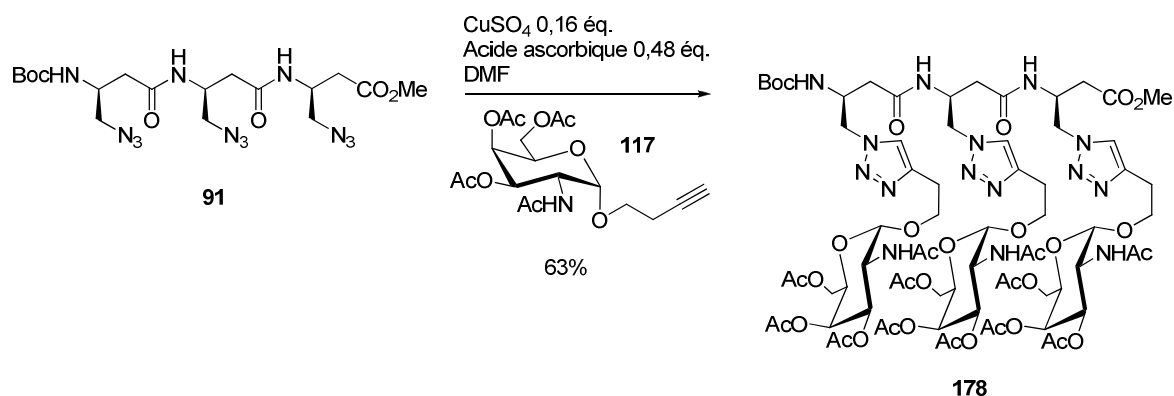


Schéma 72 – Synthèse du composé 178

3- Ligation de type oxime

Nous avons envisagé de tester les conditions de formation du lien oxime. Nous avons utilisé l'aminooxy **102** et l'aldéhyde **180**¹⁸² obtenu par ozonolyse du C-allyl glycoside **179** qui est présent sous forme d'un mélange d'anomères. Ce dernier a été synthétisé au laboratoire en appliquant des protocoles décrits.¹⁸³

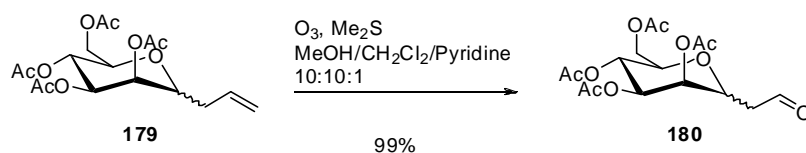


Schéma 73 – Obtention de l'aldéhyde **180** par ozonolyse

Le sucre **179** est obtenu avec un excellent rendement et une pureté satisfaisante (RMN). Il est donc utilisé sans purification afin d'éviter toute dégradation. On obtient un mélange d'anomères dont le ratio α/β , déterminé par RMN, est de 4:1.

L'aminooxy **102** est traité par 1,0 équivalent de sucre **180**, en présence d'une quantité catalytique d'acétate de sodium (0,2 équivalent) dans un mélange MeOH/H₂O 1:1.

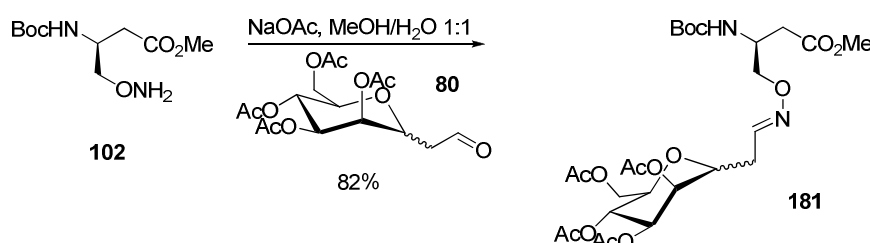


Schéma 74 – Formation de l'oxime **181**

On obtient après purification un mélange inséparable de quatre composés. On a en effet utilisé le sucre sous forme d'un mélange $\alpha/\beta = 4:1$ d'anomères et on observe sur le spectre RMN ¹H dans CDCl₃ la présence de deux isomères (*Z*) et (*E*) indifférentiables, dans des proportions 1:1, issus de la double liaison –N=C– de la fonction oxime. On observe parfaitement sur le spectre RMN les quatre isomères qui découlent de la combinaison de ces deux types de stéréochimie, notamment au niveau du proton H₅ et sur certains protons du sucre.

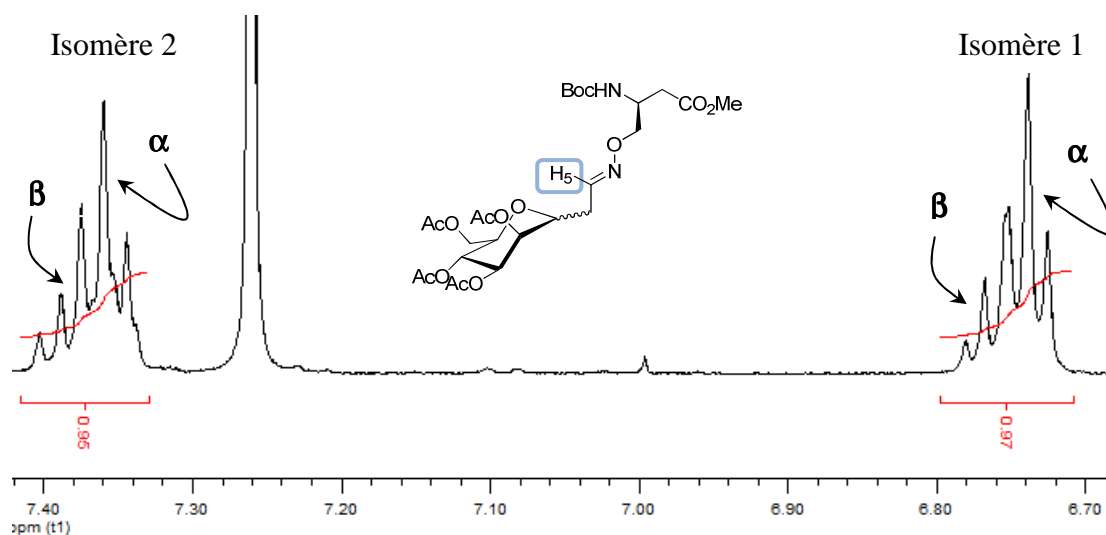


Figure 54 – Spectre RMN ^1H de l'oxime 181 - Proton éthylénique H_5

Conclusion

Les conditions réactionnelles testées nous ont permis d'obtenir le composé glycoconjugué **181**, présent sous forme d'un mélange d'isomères (*Z*) et (*E*). L'extension aux oligomères plus longs est en cours d'étude au laboratoire.

IV- Synthèse des structures pour les tests biologiques

1- Tests de reconnaissance antigène-anticorps

Les premiers tests biologiques envisagés sont des tests de reconnaissance antigène-anticorps de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) qui ont été effectués à l'Institut Pasteur, dans l'équipe du professeur C. Leclerc (Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie). Un ELISA est un dosage immunoenzymatique sur support solide dont le principe sera développé dans la Partie D « Tests Biologiques ».

a- Schéma général des structures

La structure générale des molécules devra être la suivante :

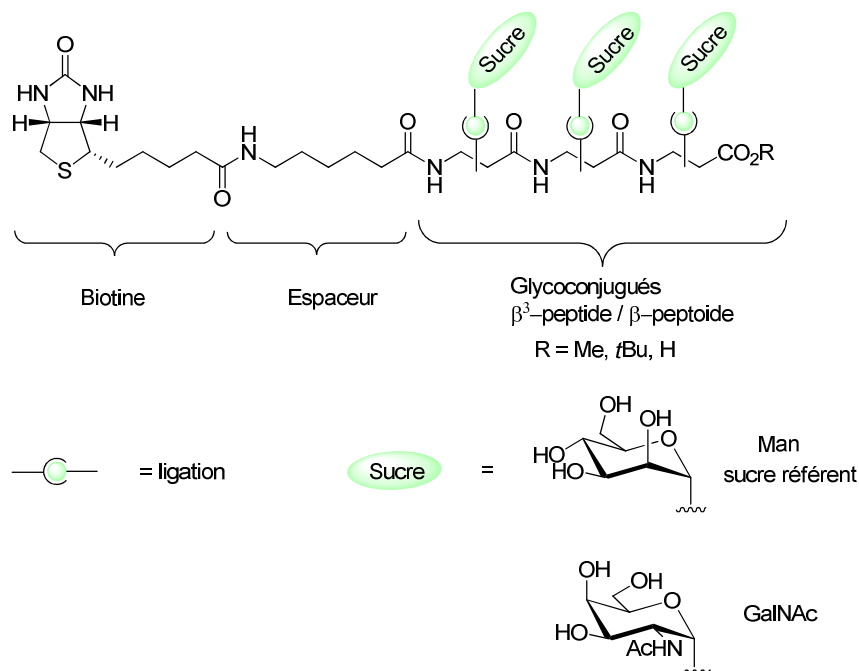


Figure 55 – Schéma générique des structures envisagées pour les tests ELISA

Les édifices seront construits par assemblage entre les différentes plateformes glycoconjuguées et la biotine préalablement apprêtée avec un espaceur. Les synthèses s'achèveront par la déprotection des unités saccharidiques suivie de la déprotection de l'extrémité C-terminale des édifices.

Les structures β-peptidiques ou β-peptoïdiques présenteront deux types de sucres : le résidu GalNAc, épitope de l'antigène Tn et du mannose qui servira de contrôle pour les tests de reconnaissance et qui permettra de mettre en évidence la spécificité de la reconnaissance.

La biotine servira à fixer les édifices glycoconjugués sur la plaque de microtitration par l'interaction avec une protéine fixée sur le fond des puits. Comme cela a déjà été évoqué, les structures ont été synthétisées de manière à mimer les clusters d'antigènes Tn, caractéristiques des mucines MUC1 de cellules néoplasiques. Il est donc nécessaire de présenter au moins deux ou trois unités glycosylées sous forme de cluster.¹⁸⁴ C'est pourquoi nous avons choisi de commencer avec les oligomères trimériques. En fonction des résultats obtenus, le travail pourra être poursuivi avec des oligomères plus longs.

b- Synthèse des composés pour les tests ELISA

i- Synthèse du motif biotine-espaceur

Nous avons choisi une approche convergente qui consiste à préparer un bloc biotine-espaceur qui est ensuite couplé aux édifices glycoconjugués. Désormais, nous y ferons référence par le terme « Biot-spacer ».

La biotine présente une fonction acide carboxylique libre qui est dans un premier temps transformée en anhydride mixte en présence de chloroformate d'isobutyle et de tributylamine dans un mélange DMF/H₂O.¹⁸⁵ Cet anhydride mixte réagit ensuite avec l'acide 6-aminocaproïque pour donner le motif Biot-spacer **182** avec un rendement de 74%. Ce composé est utilisé sans purification.

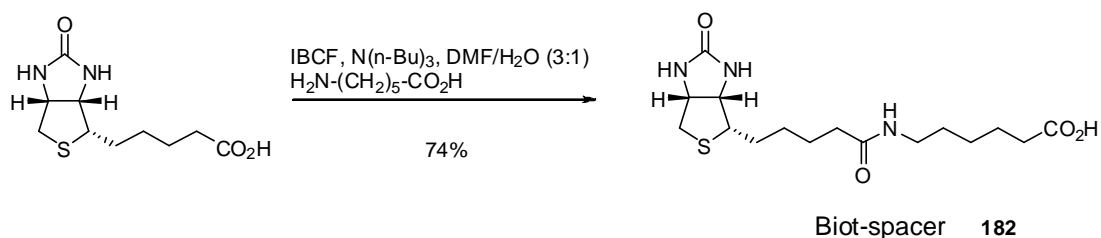


Schéma 75 – Synthèse du motif Biot-spacer 182

ii- Synthèse des structures finales

Nous avons synthétisé les composés glycoconjugués suivants (Schéma 76), greffés soit par du mannose soit par l'épitope GalNAc.

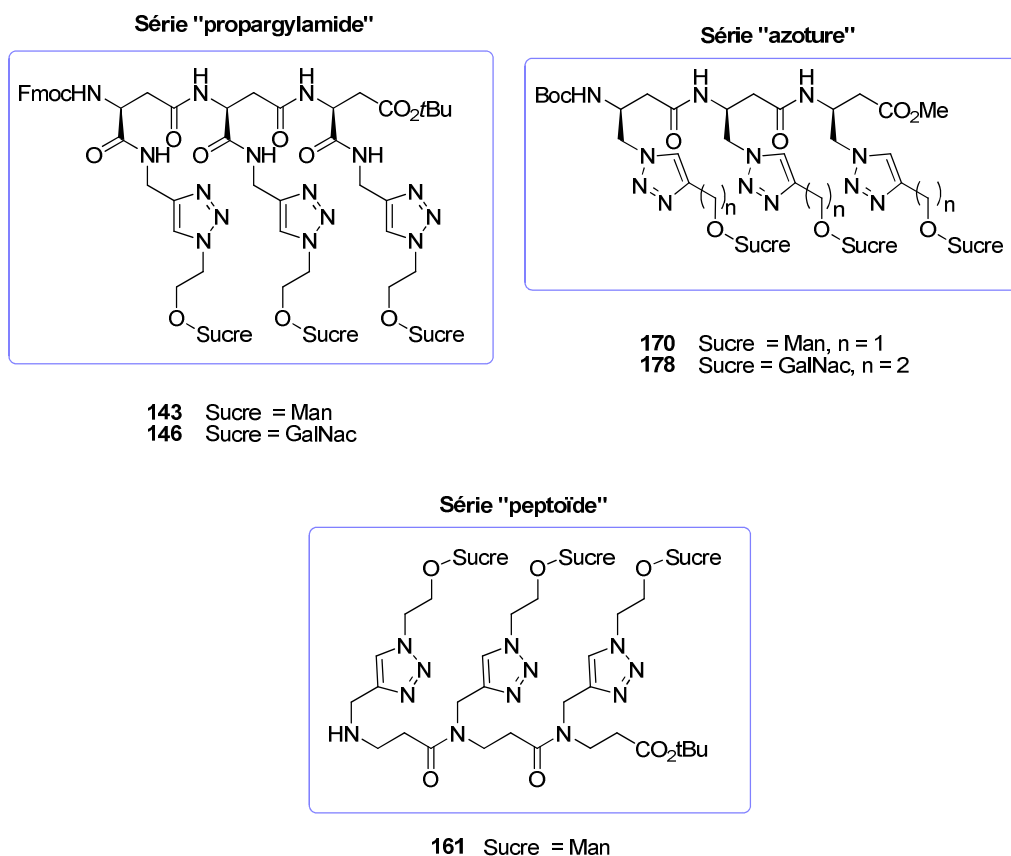


Schéma 76 – Récapitulatif des composés glycoconjugués synthétisés

De manière générale, ces édifices seront dans un premier temps déprotégés au niveau de l'extrémité *N*-terminale puis couplés par couplage peptidique au motif Biot-spacer.

(a) Série « azoture »

Les composés glycoconjugués **170** et **178** sont tout d'abord traités par de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour donner quantitativement les sels de TFA correspondants.

Le sel de TFA **170a** issu du composé **170** est ensuite couplé au motif Biot-spacer **182** en présence d'EDCi, de HOBt et de triéthylamine dans le dichlorométhane. On obtient l'édifice correspondant **183** avec un rendement de 50% après purification. Le rendement de couplage étant moyen, nous avons testé d'autres conditions pour le couplage du motif Biot-spacer **182** sur le sel de TFA **178a** issu du glycoconjugué **178**. Nous avons choisi d'utiliser HATU en présence de DIPEA dans le DMF. On obtient le produit de couplage correspondant **184** avec un rendement moyen de 63% après purification.

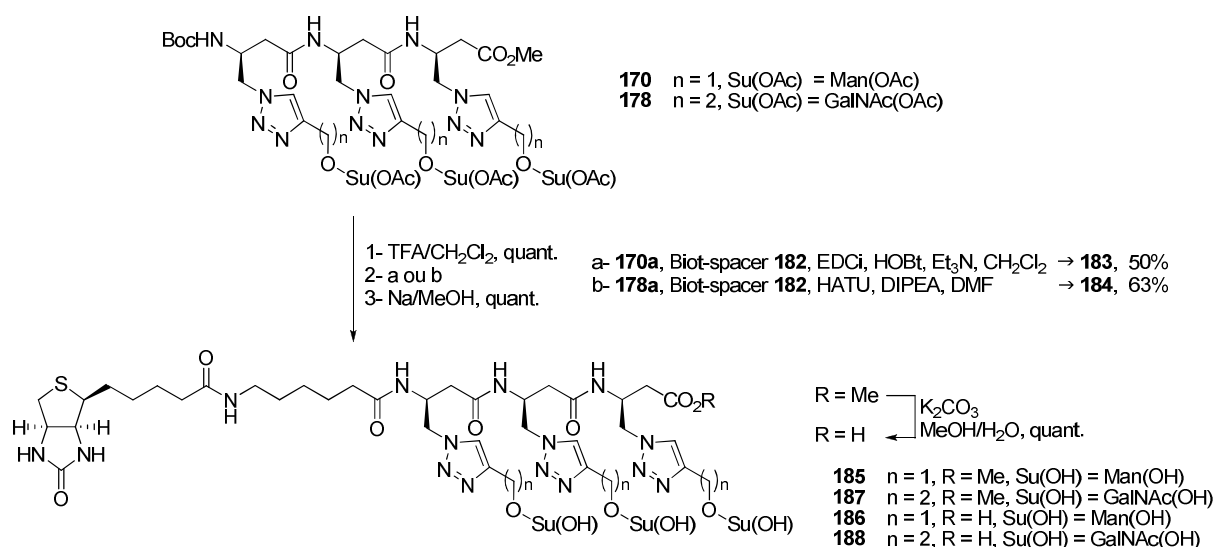


Schéma 77 – Obtention des structures finales de la série « azoture »

La désacétylation des unités saccharidiques des deux produits de couplage est effectuée dans les conditions de Zemplén (Na/MeOH) pour donner quantitativement les structures finales **185** et **187** avec une excellente pureté (HPLC > 99%). Les édifices sont ensuite déprotégés quantitativement au niveau de l'extrémité C-terminale en présence de K₂CO₃ dans un mélange MeOH/H₂O pour donner les acides correspondants **186** et **188**.¹²³

(b) Série « propargylamide »

La fonction amine est dans un premier temps libérée du groupement Fmoc par de la diéthylamine. Après purification, ces amines sont engagées dans la réaction de couplage avec le motif Biot-spacer qui est effectuée en présence de HATU et de DIPEA dans le DMF.

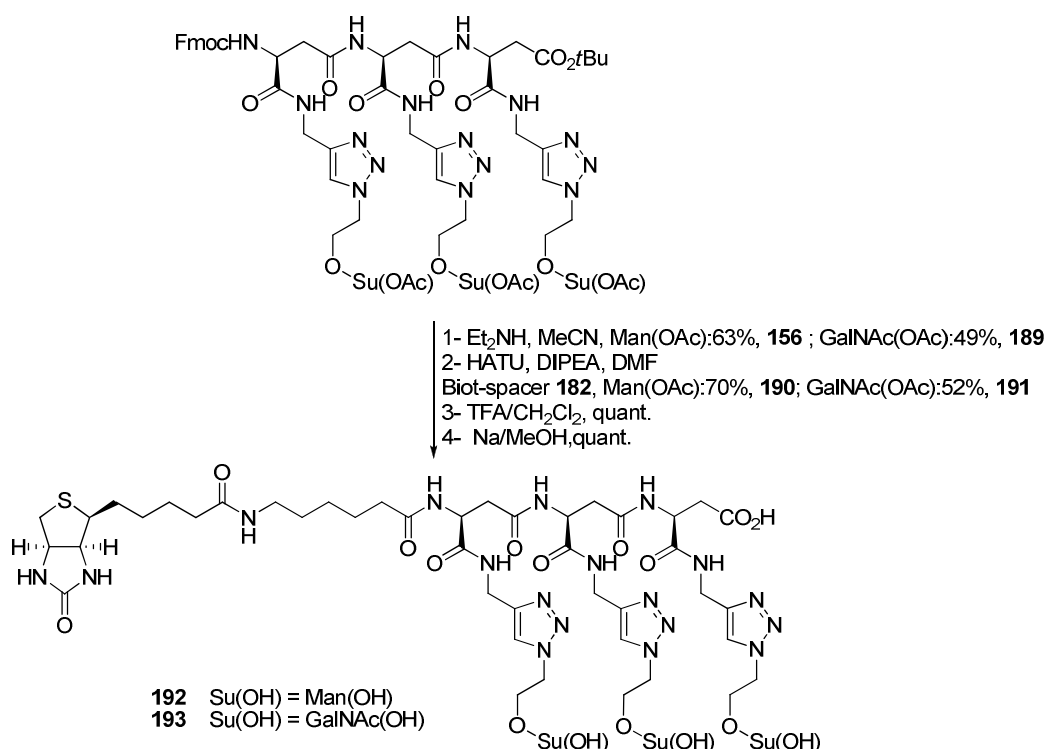


Schéma 78 – Obtention des structures finales de la série « propargylamide »

Comme observé précédemment sur le monomère glycoconjugué **141**, la présence de l'ester *tert*-butylique a de nouveau posé problème lors de la désacétylation des sucres du composé **190** (Su(OAc) = Man(OAc)). La saponification de ce composé a en effet conduit à un mélange de trois composés dont l'analyse par LC-MS a montré la présence du produit de désacétylation attendu et de deux autres composés qui, à ce jour, n'ont pas pu être identifiés. C'est pourquoi, il a été nécessaire de déprotéger les composés au niveau de l'extrémité C-terminale en présence de TFA dans le dichlorométhane afin de procéder ensuite à la déprotection des unités saccharidiques. Avec Su(OAc) = Man(OAc), on obtient bien le composé **192** attendu. En revanche, avec Su(OAc) = GalNAc(OAc), nous n'avons pas réussi à obtenir le composé **193** souhaité suite à un problème non identifié lors de la désacétylation des unités saccharidiques. Le produit attendu est obtenu en mélange avec deux sous-produits non identifiés à ce jour. Par manque de temps et de matériel de départ, la synthèse de ce composé n'a pas pu être réitérée.

(c) Série « peptoïde »

Le composé glycoconjugué **161** présentant une fonction amine secondaire libre à l'extrémité N-terminale, aucune étape de déprotection préalable n'a été nécessaire, contrairement aux séries « azoture » et « propargylamide ». Nous avons donc tenté de coupler

le motif Biot-spacer **182** sur le composé **161** en présence d'EDCi, de HOBT dans le dichlorométhane. Cependant, aucune réaction n'a été observée et le matériel de départ est récupéré intact. Le même comportement a été constaté en utilisant HATU et de la DIPEA dans le DMF : aucun produit de couplage n'est formé.

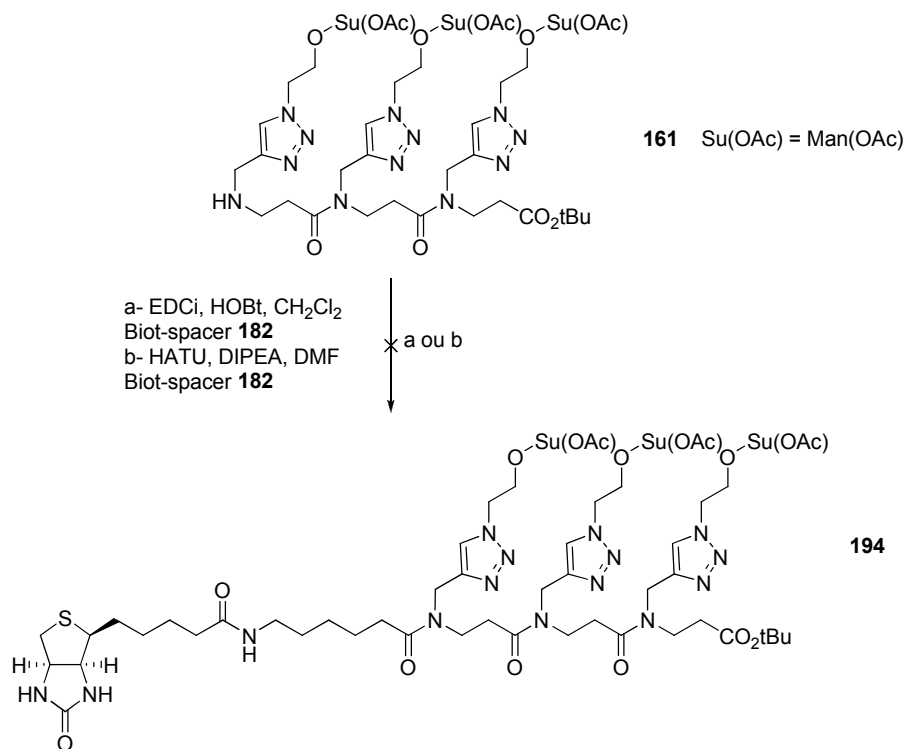


Schéma 79 – Essai d'introduction du motif Biot-spacer **182 sur le peptïde glycoconjugué **161****

Il est reconnu que les réactions de couplage peptidique sont beaucoup moins efficaces au départ d'amine secondaire du fait de leur plus faible réactivité. Ce caractère prend toute son importance dans le domaine des peptïdes. En effet, l'amine terminale engagée dans la réaction de couplage est une amine secondaire. D'autre part, l'encombrement stérique du peptïde peut, dans certains cas, avoir un effet significatif sur l'avancement de la réaction de couplage.¹⁸⁶ Dans le cas qui nous intéresse, ces deux facteurs, amine secondaire et encombrement stérique, sont réunis, ce qui peut expliquer l'absence totale de réactivité.

Nous avons donc mis au point une voie alternative pour accéder au composé **194** en contournant les problèmes évoqués ci-dessus. La première étape consiste à coupler le peptïde **160** et le motif Biot-spacer **182**, réaction réalisée avec succès en présence de HATU, de DIPEA dans un mélange CH₂Cl₂/DMF. L'encombrement stérique semble donc être la cause prédominante de l'échec des réactions de couplage. Après purification, on obtient un produit de couplage avec très bon rendement de 82%. Ce produit de couplage est ensuite

engagé dans une réaction de CuAAC en présence de 0,16 équivalent de Cu^(II) et 0,48 équivalent d'acide ascorbique dans le DMF avec 3,0 équivalents de sucre **114** (Man) ou **116** (GalNAc). Les composés glycoconjugués correspondants sont obtenus avec des rendements respectifs de 64% et 73%.

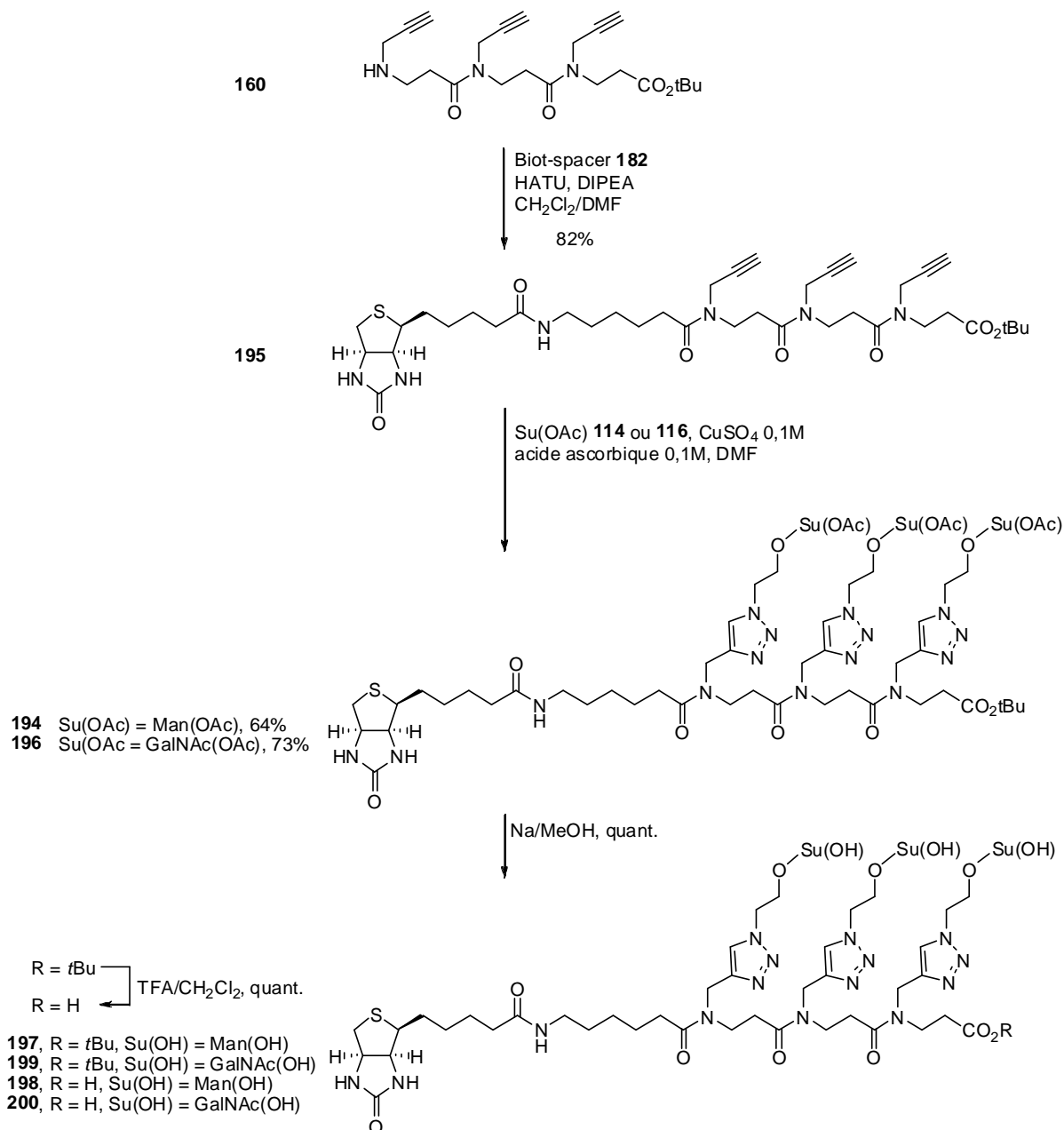


Schéma 80 – Obtention des structures finales de la série « peptide »

La désacétylation des unités saccharidiques en présence de MeONa dans le méthanol n'a posé aucun problème ici. On obtient les composés **197** et **199** de façon quantitative. Les édifices sont également déprotégés de façon quantitative au niveau de l'extrémité C-terminale en présence de TFA/CH₂Cl₂ pour fournir les acides correspondants **198** et **200**.

Conclusion

L'enchaînement initialement prévu pour l'obtention des édifices destinés à être soumis aux tests ELISA n'a pu être appliqué de façon générale à l'ensemble des trois familles de glycoconjugués que nous avons synthétisés. En effet, chacune de ces familles, de par ses propres spécificités, a nécessité une adaptation dans l'enchaînement des différentes étapes. En résumé :

- **Famille « azoture » (au départ des composés glycoconjugués)**
 1. Déprotection de la fonction amine de l'extrémité *N*-terminale sur les glycoconjugués
 2. Couplage au motif Biot-spacer **182** (EDCi, HOBT, CH₂Cl₂ et HATU, DIPEA, DMF)
 3. Désacétylation des unités saccharidiques
 4. Déprotection de l'extrémité *C*-terminale

- **Famille « propargylamide » (au départ des composés glycoconjugués)**
 1. Déprotection de la fonction amine de l'extrémité *N*-terminale
 2. Couplage au motif Biot-spacer **182** (HATU, DIPEA, DMF)
 3. Déprotection de l'extrémité *C*-terminale
 4. Désacétylation des unités saccharidiques

- **Famille « peptoïde » (au départ du peptoïde 160)**
 1. Couplage au motif Biot-spacer 182 (HATU, DIPEA, CH₂Cl₂/DMF)
 2. Introduction des unités saccharidiques **114** et **116** par réaction de CuAAC
 3. Désacétylation des unités saccharidiques
 4. Déprotection de l'extrémité *C*-terminale

2- Evaluation de la réponse immunitaire et tests de ciblage

Dans le cadre de l'évaluation de la réponse immunitaire et des tests de ciblage, différents assemblages sont envisagés à partir des plateformes glycoconjuguées que nous avons synthétisées. Certains édifices visés incorporeront le motif Pam₃-Cys-OH (tripalmitoyl-S-glycécystéine), que nous avons déjà évoqué comme étant un immunoadjuvant conduisant à l'activation des cellules dendritiques.

Les édifices envisagés seront construits de manière à obtenir le type de structure suivante :

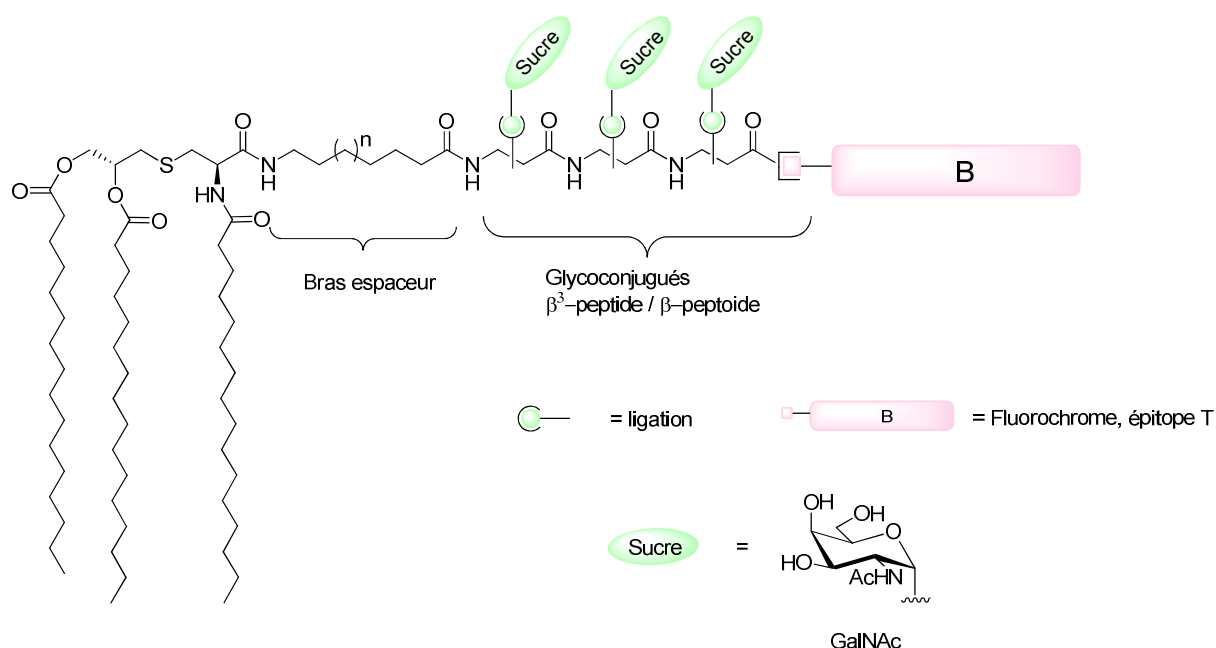


Figure 56 – Structure générique des composés pour les tests de ciblage et d'évaluation de la réponse immunitaire

Par manque de temps, nous n'avons pas pu nous intéresser à l'étape de couplage du motif lipopeptidique Pam₃-Cys-OH sur les plateformes glycoconjuguées mais nous l'avons d'ores et déjà synthétisé.

La synthèse du tripalmitoyl-S-glycercylcystéine Pam₃-Cys-OH a été réalisée avec le Dr Roland Remuson (Chargé de Recherche, membre de l'équipe) en appliquant la procédure décrite dans la littérature par Wiesmüller et *al.* pour les trois premières étapes.¹⁸⁷

Les deux fonctions acide de la L-Cystine sont dans un premier temps protégées sous forme d'ester *tert*-butylique en présence d'acétate de *tert*-butyle dans l'acide perchlorique (Schéma 81). Le composé protégé obtenu est ensuite couplé à de l'acide palmitique en présence de DCC et d'une quantité catalytique de DMAP dans le dichlorométhane. À l'issue de ces deux étapes, on obtient l'ester *N,N'*-Dipalmitoyl-cystine-di-*tert*-butylique (Pal-Cys-OtBu)₂¹⁸⁸ avec un rendement de 70%.

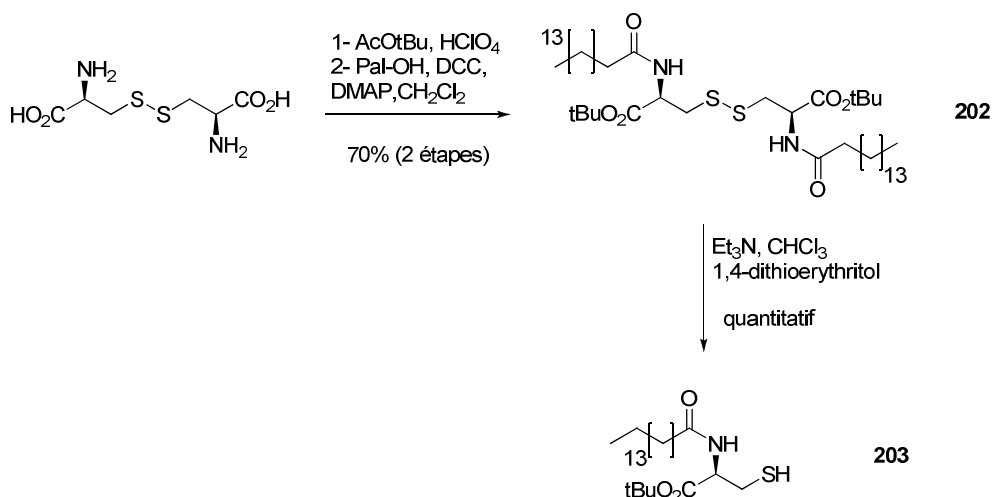


Schéma 81 – Synthèse de l'intermédiaire 203

La coupure de la liaison soufre-soufre est réalisée par traitement du (Pal-Cys-*Ot*Bu)₂ avec du dithioérythritol commercial en présence de triéthylamine dans le chloroforme. On obtient le monomère correspondant Pal-Cys-*Ot*Bu **203** de manière quantitative.

La prochaine étape de notre voie de synthèse diffère de celle décrite par Wiesmüller et *al.* En effet, les auteurs ont ensuite procédé au couplage entre le Pal-Cys-*Ot*Bu **203** et du 3-bromo-1,2-propanediol. Le prix très élevé de ce composé nous a incités à trouver une alternative synthétique. Nous avons choisi de synthétiser un analogue iodé obtenu en deux étapes à partir de (*S*)-Solketal.

Le (*S*)-Solketal, soit le (*S*)-(+)-1,2-isopropylidèneglycérol, est traité en présence de diiode, de triphénylphosphine et d'imidazole dans un mélange Et₂O/CH₂Cl₂.¹⁴³ On obtient le dérivé iodé **204**,¹⁸⁹ composé très volatile, avec un rendement de 93%.

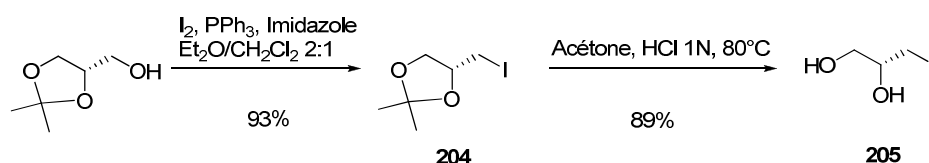
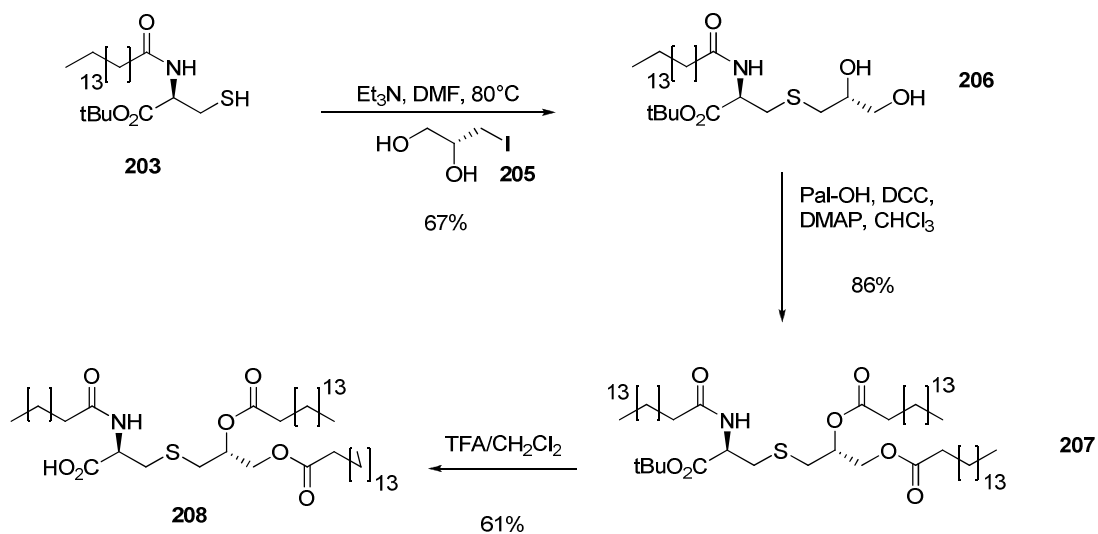


Schéma 82 – Synthèse de l'intermédiaire 205

Les fonctions alcool sont ensuite déprotégées par traitement dans l'acétone à chaud en présence d'acide chlorhydrique (1N). Le (*R*)-3-iodopropane-1,2-diol **205**,¹⁸⁹ obtenu avec un rendement de 89%, est utilisé sans purification.

Le Pal-Cys-*Ot*Bu **203** est ensuite engagé dans une réaction de substitution avec le (*R*)-3-iodopropane-1,2-diol **205** en présence de triéthylamine dans le DMF à 80°C.¹⁸⁷ On

obtient l'ester *S*-[2,3-dihydroxy-(2*R*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-cysteine-*tert*-butylique **206** avec un rendement de 67%.



Le couplage du composé **206** et de l'acide palmitique est effectuée comme précédemment en présence de DCC et d'une quantité catalytique de DMAP dans CHCl_3 pour donner l'ester *S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-cysteine-*tert*-butylique **207** avec un rendement de 86%. Sans purification préalable, le composé **207** est ensuite traité par de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour donner le tripalmitoyl-*S*-glycerylcystéine **208** avec un rendement de 61%.

Par manque de temps, la synthèse des édifices pour les tests de ciblage et d'évaluation de la réponse immunitaire s'est arrêtée à ce stade.

**D- Résultats &
Discussion :
Tests biologiques**

Introduction

L'interaction antigène-anticorps est une interaction bimoléculaire du même type qu'une interaction enzyme-substrat mais à la différence près que cette interaction ne conduit pas à une modification chimique irréversible de l'antigène ou de l'anticorps. Elle dépend de quatre types de liaisons non covalentes : liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions hydrophobes, interactions de van der Waals. La remarquable spécificité des interactions antigène-anticorps a permis le développement d'un grand nombre de techniques de dosages immunologiques basées sur ce principe. Ces dosages peuvent être utilisés à diverses fins : détection de la présence d'un antigène ou d'un anticorps, diagnostic de maladies, contrôle du niveau de la réponse immunitaire humorale, identification de molécules d'intérêt biologique.

Les tests ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) font partie de cette catégorie de tests biologiques.

1- Tests de reconnaissance antigène-anticorps – Principe de L'ELISA

Le principe de l'ELISA repose sur l'utilisation d'une enzyme conjuguée à un anticorps qui réagit avec un substrat incolore pour donner un produit de réaction coloré. Il existe différents types de dosage ELISA (indirect, sandwich, compétitif, chimioluminescence, ELISPOT) mais, dans notre cas, la technique de dosage ELISA indirect sera appliquée.

Un ELISA indirect permet de détecter et/ou doser un anticorps. Un échantillon d'antigène est adsorbé sur la surface d'une plaque de microtitration (Figure 57). Le sérum, ou l'échantillon, à doser contenant un premier anticorps, dit anticorps primaire Ac_1 , est déposé dans les puits de la plaque de microtitration et réagit donc avec l'antigène adsorbé. Un lavage permet d'éliminer l' Ac_1 en excès. La présence de l'anticorps lié à l'antigène est alors détectée par ajout d'un deuxième anticorps Ac_2 , dit anticorps anti-isotype secondaire, qui est un anti- Ac_1 . Cet anticorps Ac_2 , conjugué à une enzyme, se lie à l'anticorps Ac_1 . Le complexe Ac_2 -Enzyme peut être du type IgG-enzyme. Les enzymes telles que la peroxydase ou la phosphatase sont très largement utilisées. Un lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps Ac_2 . Un substrat de l'enzyme est alors ajouté et l'interaction enzyme-substrat produit un composé coloré. On peut donc mesurer l'absorbance par spectrophotométrie UV-Visible. L'absorbance sera proportionnelle à la quantité de complexe Ac_2 -enzyme et donc à la quantité d'anticorps Ac_1 . Ainsi, le test apportera, d'une part, une information qualitative, concernant

l'existence d'une interaction entre l'antigène fixé et l'anticorps Ac₁, preuve d'un processus de reconnaissance Ag-Ac et, d'autre part, cette information sera quantitative : si interaction il y a, il sera possible de quantifier le nombre d'anticorps Ac₁ ayant interagi avec l'antigène fixé.

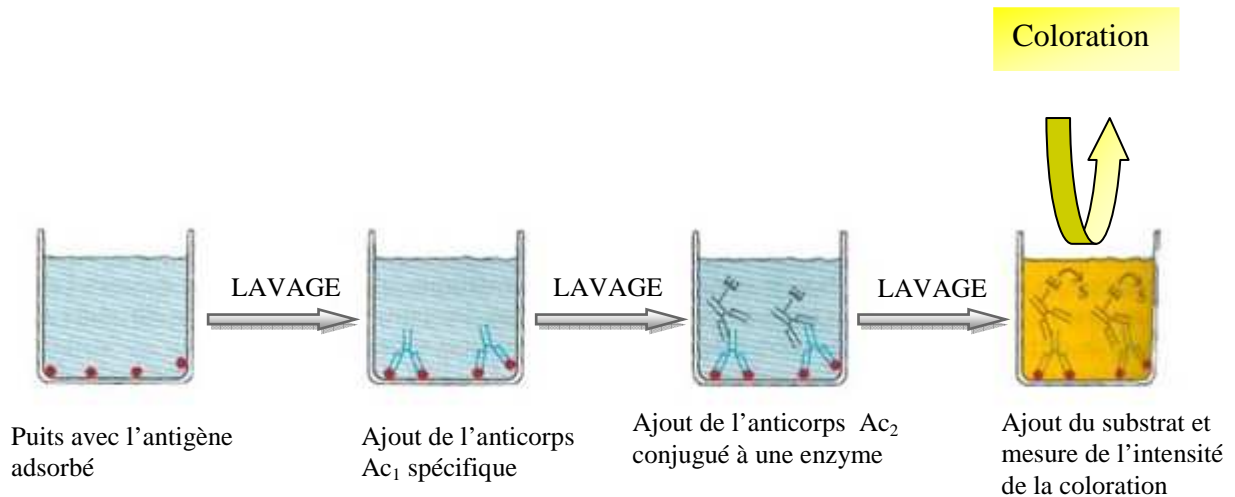


Figure 57 – Principe de l'ELISA indirect

En pratique, l'antigène, ou la structure synthétique présentant l'antigène, est adsorbé sur la plaque de microtitration par l'intermédiaire d'une interaction entre une protéine et un substrat. Plus particulièrement dans notre cas, cette interaction mettra en jeu de l'avidine ou de la streptavidine dans le rôle de la protéine et la biotine comme substrat.

Dans la nature, la biotine est une vitamine hydrosoluble connue sous le nom de vitamine H. C'est également une coenzyme qui participe au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la synthèse des vitamines B₉ et B₁₂.

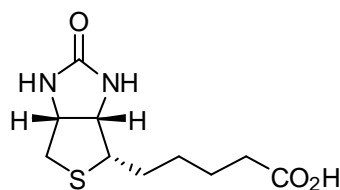


Schéma 84 – Biotine

La streptavidine, isolée de *Streptomyces avidinii*, ou l'avidine, glycoprotéine du blanc d'œuf, sont des protéines présentant quatre sites de fixation avec une affinité très forte et stable pour la biotine et les composés biotinylés. A titre d'exemple, la constante d'association K_a du complexe biotine-streptavidine est de l'ordre de $\sim 10^{15} \text{ mol.L}^{-1}$, ce qui en fait une des interactions non covalentes les plus fortes qui existent dans la nature.

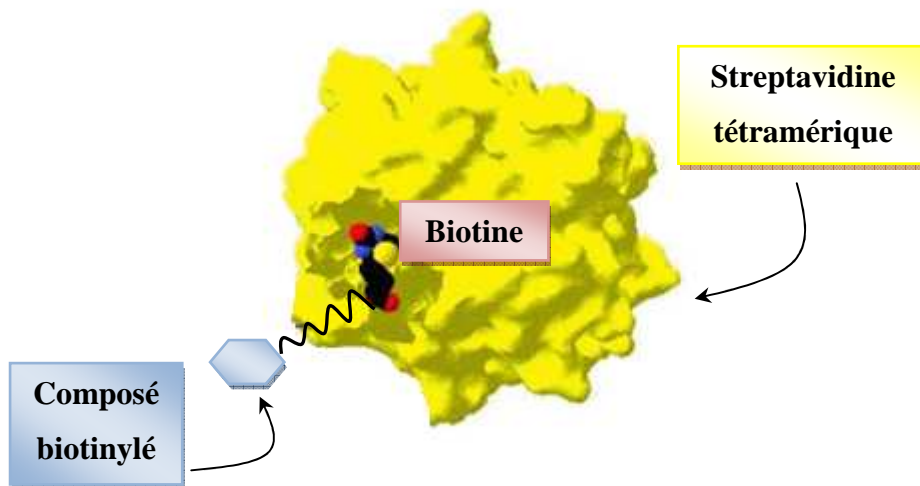


Figure 58 – Fixation d'un composé biotinylé sur la streptavidine

Les différentes interactions mises en jeu lors d'un ELISA indirect sont résumées sur le schéma suivant.

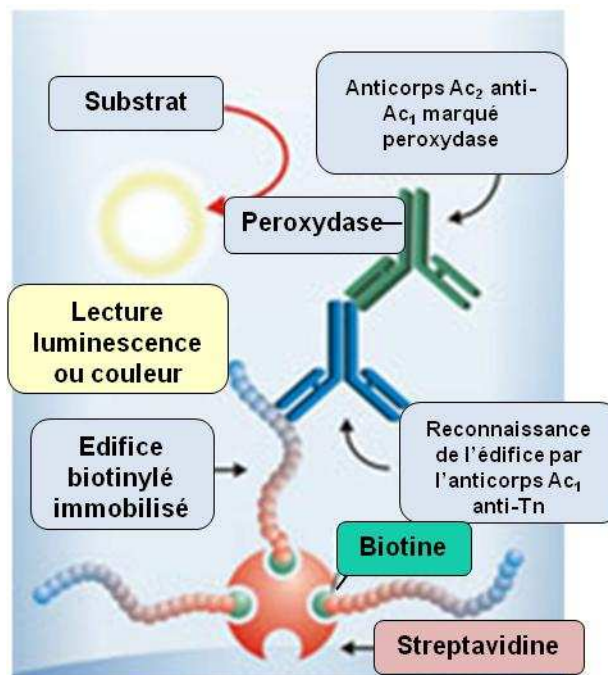


Figure 59 – Récapitulatif des interactions mises en jeu lors d'un test ELISA indirect

2- Résultats

Les structures soumises aux tests anticorps sont les suivantes (Figure 60). Il s'agit des trimères glycoconjugués des séries « azoture » et « peptóide » présentant, soit trois építopes GalNAc, soit trois unités saccharidiques dérivés de D-mannose. Ces ensembles sont couplés au motif Biot-spacer. Les structures greffées avec les résidus de D-mannose serviront de contrôle pour les tests de reconnaissance par les anticorps anti-Tn.

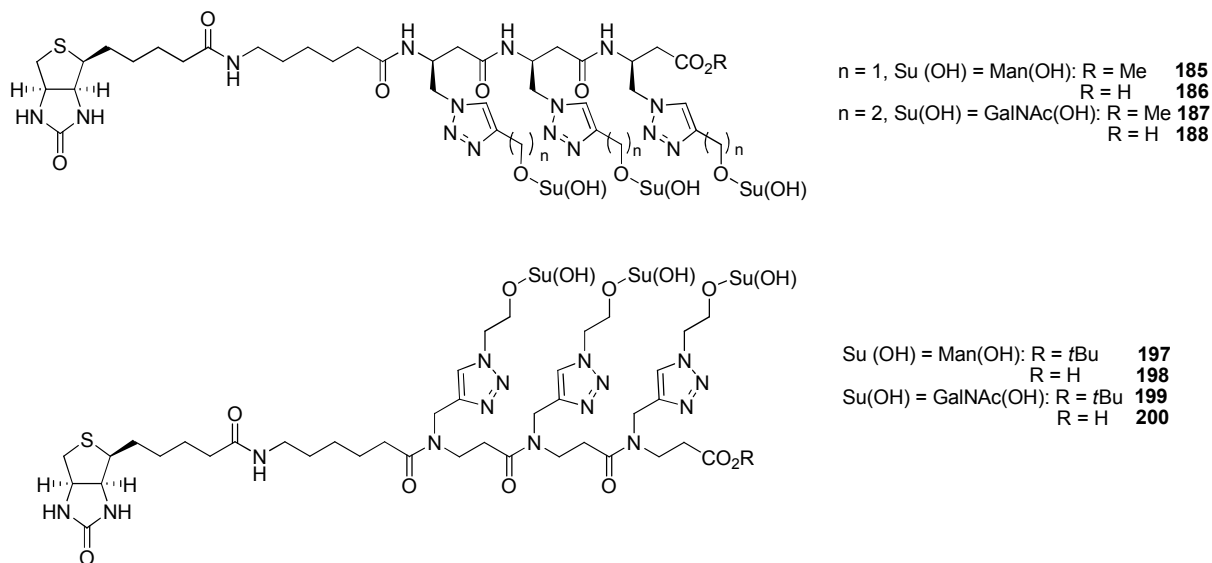


Figure 60 – Structures soumises aux tests de reconnaissance anticorps

L'évaluation de l'antigénicité des structures a été réalisée avec trois anticorps monoclonaux anti-Tn, notés mAbs (*monoclonal Antibody*). Pour des raisons de propriétés intellectuelles, il ne nous est pas possible de communiquer le nom de ces anticorps. Nous les nommerons donc anticorps mAb#1, mAb#2 et mAb#3. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 61.

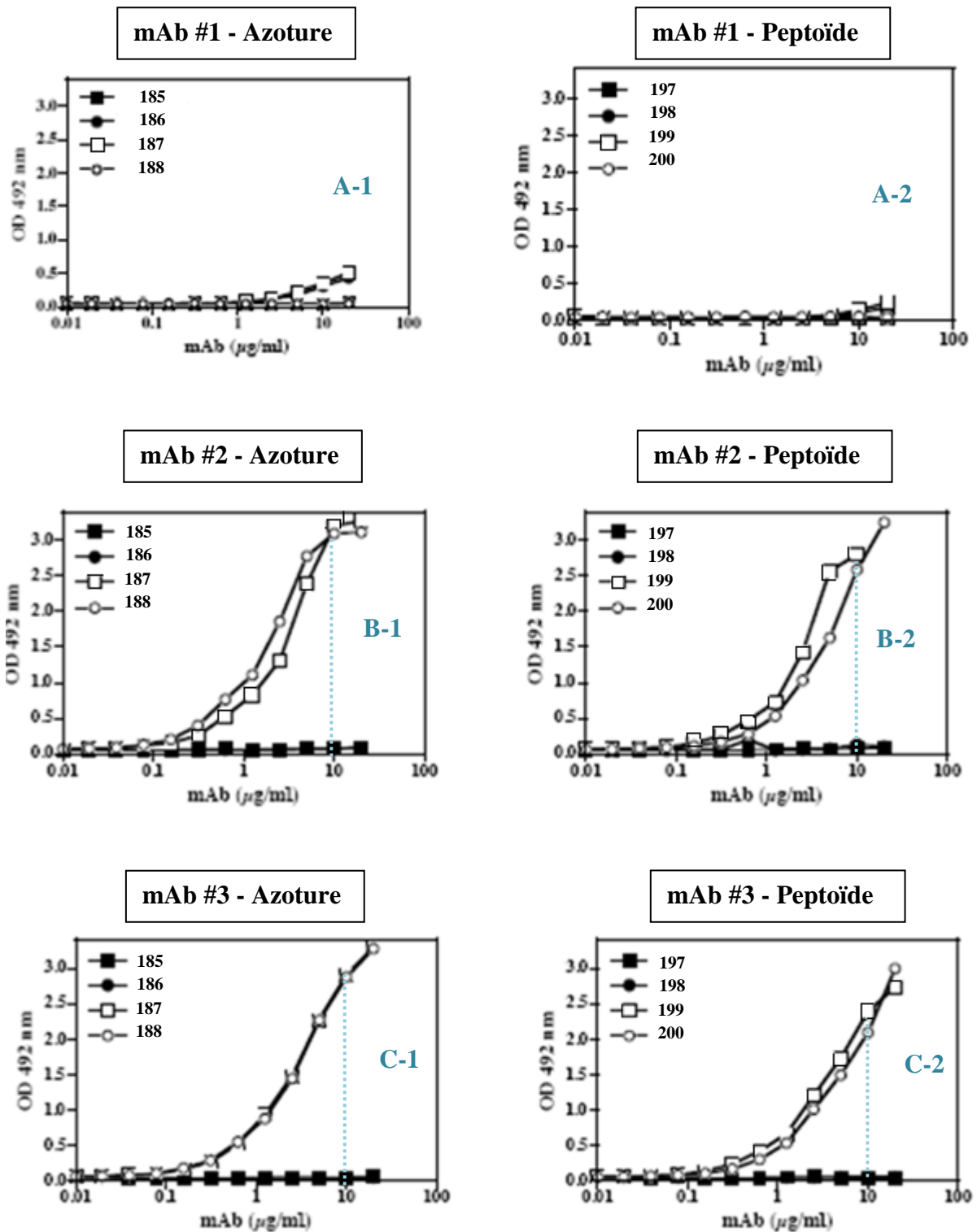


Figure 61 – Résultats des tests anticorps pour les séries « azoture » (1) et « peptide » (2) avec trois anticorps monoclonaux : A) anticorps mAb#1 – B) anticorps mAb#2 – C) anticorps mAb#3

On constate bien que les structures de contrôle (Su(OH) = Man(OH)) ne sont reconnues par aucun des trois anticorps utilisés. Ceci suggère que les édifices (plateforme + sucre différent de GalNAc) ne présentent aucune antigénicité vis-à-vis des anticorps monoclonaux testés ici.

Les graphes **A-** montrent que l'anticorps anti-Tn mAb#1 reconnaît mal les différentes structures. Cet anticorps est plus stringent que les autres mAbs dans sa manière de reconnaître l'antigène Tn. Il nécessite notamment que les résidus GalNAc soient portés par des aminoacides naturels ; il ne reconnaît pas les résidus GalNAc sur des résidus homosérine ou acide glycolique, ce qui explique les résultats observés spécifiquement avec nos structures. De plus, il reconnaît plus faiblement les antigènes Tn natifs sur les cellules tumorales. Mais tout cela reste à confirmer.

En revanche, on observe une très bonne reconnaissance de l'ensemble des autres structures par les deux autres anticorps mAb#2 et mAb#3 (Graphes **B-** et **C-**). Ces profils de reconnaissance sont tout à fait comparables à ce qu'on peut observer dans la littérature.^{190,191} On remarque tout d'abord que les édifices sont très bien reconnus, que l'extrémité C-terminale soit sous forme d'ester (-□-) ou d'acide (-○-). Il semblerait donc que la nature chimique de l'extrémité C-terminale n'ait pas d'influence sur le phénomène de reconnaissance des épitopes GalNAc par les anticorps. Dans le cas de l'anticorps mAb#2, on observe une très légère différence entre les formes acide et ester. Cette différence est quasiment absente dans le cas de l'anticorps mAb#3: les courbes sont même totalement superposées dans la série « azoture » (graphe **C-1**).

La comparaison des deux familles « azoture » et « peptoïde » nous amène à constater une reconnaissance relativement similaire par les deux anticorps mAb#2 et mAb#3. De façon générale, à concentration égale en anticorps, les structures de la série « azoture » sont mieux reconnues ($OD_{492nm}(10\mu g/L) \sim 3,0$) que les structures de la famille « peptoïde » ($OD_{492nm}(10\mu g/L) \sim 2,5$ à $3,0$).

Conclusion

A l'issue de ces tests préliminaires, nous avons pu montrer l'antigénicité des structures que nous avons synthétisées. La reconnaissance des édifices glycoconjugués par des anticorps anti-Tn était une prérogative indispensable pour la poursuite du projet. Désormais, avec ces informations, la synthèse des structures de type candidat vaccin pourra être mise en œuvre pour leur évaluation en immunothérapie anticancéreuse à proprement parlé.

**E- Résultats &
Discussion :
Analyse
conformationnelle**

I- Rappels bibliographiques : Techniques d'analyse conformationnelle

Introduction

Plusieurs techniques spectroscopiques existent afin d'étudier les préférences conformationnelles d'oligomères présentant des propriétés de repliement. Les structures sont stabilisées par des interactions faibles, de type liaison hydrogène ou dipôle-dipôle, mais également¹⁹² par des effets de répulsion stériques qui joue un rôle non négligeable.

De manière générale, les techniques habituellement utilisées sont la résonance magnétique nucléaire, l'infrarouge en solution, le dichroïsme circulaire, la microscopie électronique à balayage, la diffraction des rayons X et la modélisation moléculaire. Quelles que soient les techniques utilisées, c'est la confrontation et la corrélation des différents résultats obtenus qui permettent de déterminer avec la plus grande certitude possible la structure tridimensionnelle d'une molécule.

1- Résonance Magnétique Nucléaire RMN

La spectroscopie par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) est la technique incontournable pour l'élucidation de la structuration tridimensionnelle de peptides et de protéines en solution.

Il existe trois types d'analyses : la RMN à une dimension (1D), à deux dimensions (2D), à trois dimensions (3D). De manière générale, les analyses par RMN 1D et 2D sont les plus souvent utilisées.

L'échantillon doit être préparé dans une gamme de concentration qui doit permettre de réaliser une analyse qui soit indépendante de tout phénomène et interaction qui ne soient pas dus au processus de repliement. Ainsi, on doit se situer entre 8 mM et 15 mM.^{61,77} Une concentration trop basse impliquerait une perte de résolution due à la sensibilité du spectromètre RMN ; une concentration trop élevée pourrait induire des phénomènes d'agrégation intermoléculaire, ce qui aurait des conséquences sur l'allure du spectre et pourrait fausser son interprétation.

a- RMN à une dimension (RMN 1D)

i- Etude qualitative

L'observation qualitative du spectre ^1H peut dans un premier temps fournir des informations intéressantes relatives à la structuration potentielle de la molécule étudiée.

Des informations précieuses peuvent être issues de l'analyse de spectre ^1H en se basant sur la dispersion des signaux, la valeur des déplacements chimiques et des constantes de couplage.

❖ Dispersion des déplacements chimiques

L'observation de l'ensemble du spectre d'un oligomère mais plus particulièrement la zone des NH d'amide peut donner des informations sur la présence ou l'absence de structuration de manière générale. Loin d'en faire une règle générale, il a souvent été observé qu'un oligomère adoptant une structuration secondaire particulière présentait une bonne dispersion de ses signaux.^{193,194} Ceci est particulièrement vrai pour la région des NH d'amide dans le cas d'oligoamides structurés.

Le déplacement chimique de ces protons NH d'amide dépend naturellement du solvant utilisé pour l'étude. Par exemple, l'expérience a montré que dans CDCl_3 , la zone des NH non engagés dans une liaison hydrogène se situait entre 6,9 ppm à 7,2 ppm alors que ceux impliqués dans une liaison hydrogène résonnaient à des champs plus bas, typiquement entre 7,9 ppm à 8,8 ppm.¹⁹⁵

❖ Valeur des constantes de couplage

Les constantes de couplage peuvent donner des informations relatives à la conformation locale de la molécule et peuvent permettre de remonter aux angles dièdres correspondants.

Ainsi, dans le cas des β -peptides, si les constantes de couplage entre un proton H-C_β et chacun des deux protons H-C_α sont très différentes, cela signifie, qu'à l'échelle de temps de la RMN, il n'y a pas de rotation libre autour de l'angle dièdre $\text{HN-C}_\beta\text{-C}_\alpha\text{-CO}$ du résidu concerné, ce qui indique la présence d'une conformation préférentielle.⁴⁶

Par ailleurs, des valeurs de constantes de couplage élevées, notamment $^3J(\text{NH}, \text{H-C}_\beta)$ (7,0 – 9,2 Hz) et $^3J(\text{H-C}_\alpha, \text{H-C}_\beta)$ (9,9 – 11,9 Hz), comme l'a montré entre autres Seebach,⁶⁵ indiquent que les rotations autour des liaisons N-C_β et $\text{C}_\beta\text{-C}_\alpha$ sont fortement restreintes et que

les protons impliqués sont dans un environnement antipériplanaire. Cette déduction est issue de l'équation de Karplus :

$${}^3J = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$$

Au delà de l'observation qualitative du spectre ${}^1\text{H}$ qui est loin d'être suffisante, il existe des expériences plus fines qui permettent d'ajouter des preuves de la présence d'une structuration secondaire afin d'en déterminer la nature.

ii- Etude en température

Les études en température par RMN s'appliquent aux protons d'amide NH dont on étudie la variation de déplacements chimiques en fonction de la température. Ceci fournit des renseignements sur la présence de liaisons hydrogène. La variation de température peut en effet avoir une influence sur la valeur des déplacements chimiques des protons d'amide NH. On appelle cette variation le coefficient de température :

$$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} = \frac{\delta_2 - \delta_1}{T_2 - T_1}$$

Les coefficients de température peuvent donner des indications précieuses sur la présence de liaisons hydrogène.¹⁹⁶ Dans le cas des structures peptidiques, de manière générale, on considère qu'un proton d'amide NH dont le coefficient de température est supérieur à -6 ppb/°C (ou -4 ppb/°C selon les auteurs) est engagé dans une liaison hydrogène, tandis qu'un proton d'amide NH ayant un coefficient de température inférieur à cette valeur charnière sera un proton exposé, non engagé dans une liaison hydrogène. Certains auteurs conseillent cependant de corréler les résultats obtenus à l'issue d'une expérience en température avec les résultats d'une expérience d'échange isotopique.¹⁹⁷

Lors de ces études en température de β -peptides, on peut également observer l'évolution des constantes de couplage 3J (NH, H-C $_{\beta}$) et 3J (H-C $_{\alpha}$, H-C $_{\beta}$), en rapport avec l'angle dièdre HN-C $_{\beta}$ -C $_{\alpha}$ -CO. Si celles-ci sont conservées, alors ceci indique que la molécule adopte une structuration secondaire très stable et ordonnée.¹⁹⁸

Par ailleurs, la conservation de l'éclatement des signaux au cours de l'expérience indique la présence d'une structuration secondaire stable.

iii- Echange hydrogène-deutérium

Les expériences d'échange entre le proton d'un amide d'un peptide et le deutérium d'un solvant deutéré, appelé échange isotopique, sont un excellent moyen de prouver l'existence de liaisons hydrogène au sein du peptide.

Un échantillon de peptide est mis en présence d'un solvant deutéré. Le but est d'enregistrer les spectres ^1H à intervalles de temps connus afin de suivre l'évolution des signaux des NH. La diminution rapide et/ou la disparition d'un signal de NH indiquera que ce proton n'est pas engagé dans une liaison hydrogène. Au contraire, la présence continue ou la disparition lente du signal d'un NH indiquera qu'il est engagé dans une liaison hydrogène. La vitesse de disparition du signal donnera des informations sur la force de la liaison hydrogène impliquée. Il existe principalement deux méthodes :

- ❖ Utilisation d'un solvant deutéré protique, tel que le méthanol- d_4 qui permet à la fois de solubiliser l'échantillon et de permettre l'échange isotopique
- ❖ Solubilisation de l'échantillon dans un solvant deutéré aprotique et ajout d'une quantité minime d'eau lourde (D_2O) comme source isotopique.

iv- Titration au DMSO-d_6

Cette méthode de titration repose sur le fait que le DMSO-d_6 est un excellent accepteur de liaisons hydrogène et peut donc entrer en compétition avec les C=O d'amide de l'oligomère étudié. On s'intéresse ici à la variation de déplacements chimiques des NH d'amide en fonction de la concentration en DMSO-d_6 . Une faible variation indiquera l'implication du proton concerné dans une liaison hydrogène.¹⁹⁹

b- RMN à deux dimensions (RMN 2D)

L'étude structurale des protéines et des peptides passe nécessairement par des expériences de RMN à deux dimensions.

Certaines expériences rentrent dans le cadre de l'attribution des signaux du spectre ^1H car elles fournissent des informations à l'échelle locale. On utilise communément les expériences de COSY (*CORrelation SpectroscopY*, ^1H - ^1H), TOCSY (*TOTAL Correlation SpectroscopY*, ^1H - ^1H dans un même système de spin, par exemple un même résidu acide aminé dans un peptide), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*, ^1H - ^{13}C) et

HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, ^1H - ^{13}C). Ces méthodes sont basées sur des interactions qu'on appelle couplage scalaire et qui passent par un réseau d'atomes.

D'autres expériences en revanche permettent d'obtenir des informations dans l'espace sur la structuration tridimensionnelle d'une molécule. Dans ce cas, on utilisera la NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) et la ROESY (*Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*).

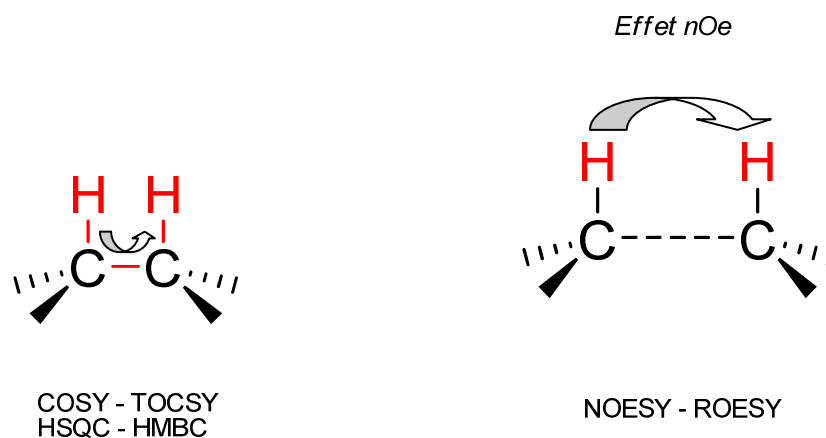


Figure 62 – Corrélation scalaire et corrélation dipolaire

Ces deux méthodes sont basées sur les interactions entre les spins magnétiques de deux atomes d'hydrogène i et j proches dans l'espace, qu'on appelle couplage dipolaire. La variation de l'intensité du signal du proton i due à son couplage dipolaire avec le proton j s'appelle effet nucléaire Overhauser, noté nOe (*nuclear Overhauser effect*). La variation de l'intensité du couplage dipolaire dépendant de la distance entre les protons i et j , l'effet nOe observé variera en fonction de cette distance dans l'espace.

L'intensité des corrélations entre les protons i et j est inversement proportionnelle à la distance qui les sépare dans l'espace selon la formule suivante :

$$r_{i,j} = r_{réf} \times \sqrt[6]{\frac{a_{i,j}}{a_{réf}}}$$

où $r_{i,j}$ est la distance calculée entre les protons i et j

$r_{réf}$ est la distance entre deux protons de référence

$a_{i,j}$ est le volume de la corrélation entre les protons i et j

$a_{réf}$ est le volume de la corrélation entre les deux protons de référence.

La distance maximale pour détecter des corrélations est de 5Å.

Il est essentiel de mettre au point des conditions expérimentales adéquates qui fourniront un spectre avec une bonne résolution et qui permettront d'observer correctement les corrélations nOe. Il faut notamment déterminer le temps de mélange le plus adapté. C'est le paramètre le plus important à fixer pour les expériences de NOESY. Le temps de mélange est le temps pendant lequel un nOe est transféré entre deux protons. Il faut donc que ce temps soit suffisamment long afin de permettre aux deux spins de se voir dans l'espace et d'obtenir un nOe d'intensité acceptable. A contrario, un temps de mélange trop long peut générer une diffusion de nombreux spins, générant des nOe inexacts. Il peut donc être nécessaire d'enregistrer plusieurs expériences afin de déterminer le temps de mélange le plus adapté. De façon générale, on considère que pour les molécules de petites tailles ($< 1000 \text{ g.mol}^{-1}$), le temps de mélange doit être proche de 400 ms et pour les molécules de plus grande taille ($>1500 \text{ g.mol}^{-1}$), il doit être fixé aux alentours de 200 ms.

Pour des structurations en hélices, on sait maintenant que chaque type d'hélice présente un jeu de corrélations qui lui sont propres.

Rappelons les types d'interactions mises en jeu dans les différents types d'hélices qui ont été décrites à ce jour.

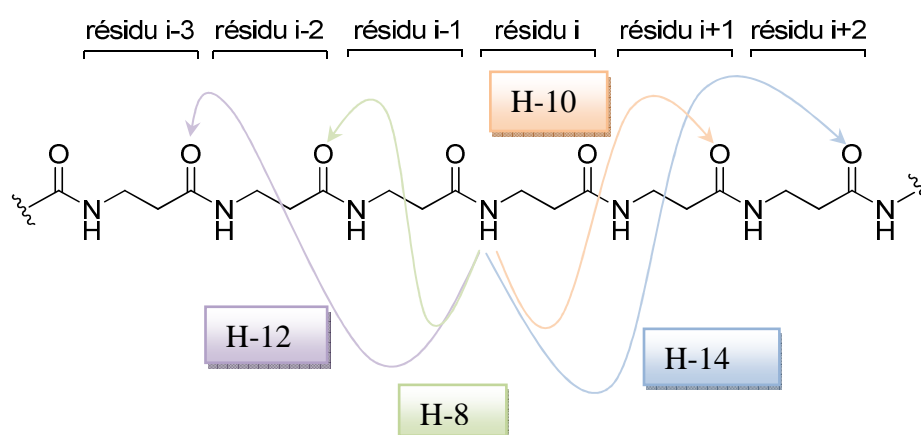


Figure 63 – Récapitulatif des liaisons hydrogène mises en jeu selon les différents types d'hélice

L'identification des corrélations caractéristiques donne ainsi de précieuses informations relatives à la nature de l'hélice concernée. On a la possibilité d'observer des couplages dipolaires impliquant des protons d'amide NH mais d'autres protons peuvent fournir des informations ($C_{\alpha}H$, $C_{\beta}H$).

Hélices	$^3J(\text{NH}-\text{C}_\beta\text{H})$	nOe observées
H-14	8,5 – 12 Hz	NH _i – NH _{i+1} ; NH _i – C _α H _{i-1} NH _i – C _α H _i ; NH _i – C _β H _{i+2} NH _i – C _β H _{i+3}
H-12	8 – 9 Hz	NH _i – C _β H _{i+2} ; C _β H _i – C _α H _{i+2} C _β H _i – C _α H _{i+3}
H-10/12	7 – 9 Hz	NH _i – C _β H _{i+2} ; NH _i – C _β H _{i+3} NH _i – C _β H _{i-2} ; NH _i – C _β H _{i-3} NH _i – C _α H _{i+2} ; C _β H _i – C _α H _{i+2} C _β H _i – C _α H _{i+3}
H-10	-	NH _i – C _β H _{i+2} ; NH _i – C _β H _{i+1} C _β H _i – C _α H _{i+2}
H-8	9 – 10 Hz	NH _i – NH _{i+1} ; NH _i – C _β H _{i-1} NH _i – C _α H _{i-1}

Tableau 9 – Récapitulatif des nOe attendus en fonction du type d'hélice

2- Dichroïsme Circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire est une technique utilisée pour l'élucidation des structures secondaires des protéines et des peptides. Le DC est une méthode chiroptique nécessitant que la molécule analysée présente une activité optique. La première utilisation pratique de cette technique est rapportée en 1965 par Holzwarth et Doty²⁰⁰ et concernait l'étude d'une hélice α . Avec le temps, le DC est devenu une technique de routine employée pour la détermination de structures secondaires de peptides, de protéines, d'acides nucléiques et d'oligo- ou polysaccharides.

Quand la lumière traverse une substance optiquement active possédant un ou plusieurs chromophores, non seulement les vitesses des composantes droite et gauche d'un faisceau de lumière polarisée deviennent différentes, aboutissant à deux longueurs d'onde différentes, mais ces deux composantes sont aussi absorbées avec deux amplitudes différentes.²⁰¹ En effet, de manière générale, la vitesse des deux ondes lumineuses est diminuée par l'interaction avec la molécule chirale. Une de ces ondes (droite ou gauche) est cependant plus retardée que l'autre, ce qui génère une nette bande d'absorption.²⁰² Cette différence entre les absorptions est appelée dichroïsme circulaire DC et peut être défini par la formule suivante.

$$DC = A^g - A^d$$

où A^g et A^d désignent respectivement les absorbances des composantes gauche (g) et droite (d) du faisceau de lumière circulairement polarisée. L'absorbance étant définie par la loi de Beer-Lambert, on arrive à la définition suivante du DC :

$$DC = \varepsilon_g \cdot l \cdot C - \varepsilon_d \cdot l \cdot C \quad \text{d'où} \quad \boxed{DC = \Delta\varepsilon \cdot l \cdot C}$$

où $\Delta\varepsilon$ est la différence d'absorption molaire, soit la différence des coefficients d'extinction

l est le chemin optique parcouru par la lumière à travers l'échantillon (cm)

C est la concentration de l'échantillon (mol.L^{-1})

L'équation précédente met en évidence le fait que le DC ne peut être mesuré qu'en correspondance avec des bandes d'absorption. Ce qu'on observe sur le spectre est un pic dichroïque, appelé effet *Cotton*, du nom de son découvreur.²⁰³

Le dichroïsme circulaire est mesuré par l'ellipticité θ . Le terme d'ellipticité fait référence à la forme elliptique prise par le vecteur électrique lorsqu'une des deux formes de la lumière est absorbée par l'échantillon de manière différente de l'autre forme. La trajectoire de la lumière devient au fur et à mesure une ellipse.

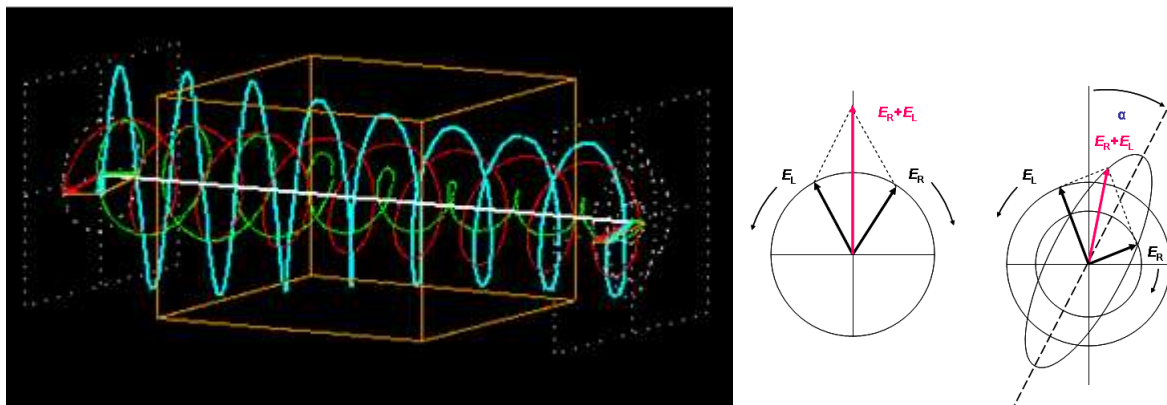


Figure 64 – Trajectoire elliptique de la lumière

La lumière, de nature ondulatoire, voit sa trajectoire progressivement devenir elliptique (Faisceau bleu – Figure 64). Cette ellipticité est transformée à chaque longueur d'onde en une valeur qui dépend de la masse molaire de l'échantillon, de sa concentration et du chemin optique selon la formule suivante.²⁰⁴ Cette valeur est appelée ellipticité molaire :

$$[\theta] = \frac{\theta.M}{l.C}$$

avec $[\theta]$ est l'ellipticité molaire ($\text{deg.cm}^{-2}.\text{dmol}^{-1}$)

θ est l'ellipticité (mdeg)

M est la masse molaire (g.mol^{-1})

l est le chemin optique (mm)

C est la concentration de l'échantillon (g.L^{-1})

Pour la comparaison d'oligomères appartenant à la même série, il est nécessaire de normaliser la valeur de l'ellipticité molaire en la convertissant en ellipticité par résidu :

$$[\theta]_{res} = \frac{\theta.M}{l.C.n} = MRE$$

où $[\theta]_{res}$ est l'ellipticité par résidu ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), notée MRE (Main Residue Ellipticity)

n est le nombre de résidus

Plusieurs solvants peuvent être utilisés pour solubiliser l'échantillon à analyser. Cependant, la transparence du solvant dans la gamme de longueur d'onde étudiée est essentielle afin de ne pas altérer les informations collectées.

Le DC est une technique très sensible : il est possible d'enregistrer les spectres de DC pour des échantillons de concentrations $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Dans le cas des peptides, la liaison peptidique constitue un chromophore qui absorbe dans l'UV lointain vers 220 nm (transition $n \rightarrow \pi^*$) et vers 140 nm et 190 nm (transition $\pi \rightarrow \pi^*$). La transition $n \rightarrow \pi^*$ d'une liaison amide, bien que faible ($\epsilon_{\text{max}} < 100$) possède une énergie relativement sensible à la formation de liaison hydrogène. Les chromophores présents sur les chaînes latérales peuvent également avoir une influence sur le DC.

L'ellipticité dépend de la conformation de la molécule. Les structures ordonnées telles que les hélices, les feuilletts et les coudes, présentent un macrodipôle qui leur est

caractéristique qui génèrera des absorptions qui lui seront propres. Ainsi, le spectre de DC sera caractéristique d'un certain type de structure (Figure 65).

Cependant, une étude théorique menée par le groupe de Seebach a montré que des spectres de DC similaires pouvaient résulter de différentes conformations.²⁰⁵ C'est pourquoi les observations faites sur la base d'un spectre de DC doivent être corrélées à des résultats issus d'autres expériences, notamment de RMN ou de diffraction des rayons X quand cela est possible. Il n'en reste pas moins que l'étude par DC d'un oligomère peut, dans un premier temps, renseigner sur l'existence ou l'absence d'une préférence conformationnelle. La présence de plusieurs structures ordonnées peut d'ailleurs être observée à l'intérieur d'un même spectre.²⁰⁶

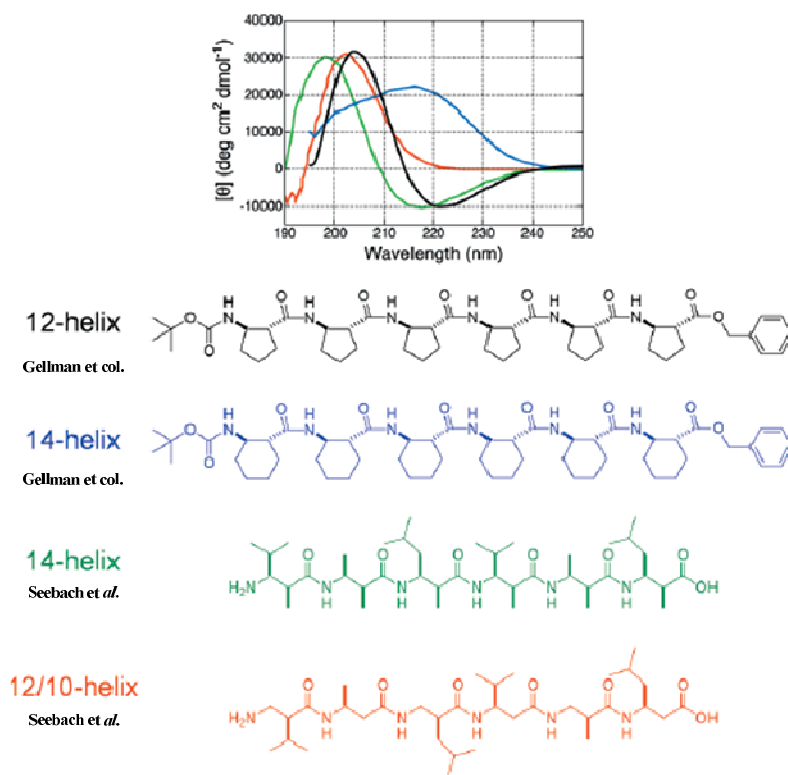


Figure 65 – Profil de dichroïsme circulaire dans le méthanol en fonction du type d'hélice

3- Infrarouge

La spectroscopie infrarouge est l'une des plus anciennes techniques expérimentales utilisées pour l'analyse des structurations secondaires des polypeptides et des protéines. Plus particulièrement, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) permet la mesure de la longueur d'onde et de l'intensité de l'absorption d'une radiation IR par un

échantillon. De façon générale, dans le cas des polymères, les données expérimentales sont interprétées en termes de vibration d'unité structurale répétitive qui donnent naissance à neuf bandes d'absorption caractéristiques relatives à la liaison peptidique et qui sont résumées dans le tableau suivant.²⁰⁷

Bande caractéristique	Nombre d'onde approximatif (cm ⁻¹)	Description
Amide A	3300	NH élongation
Amide B	3100	NH élongation
Amide I	1600-1690	C=O élongation
Amide II	1480-1575	CN élongation NH déformation
Amide III	1229-1301	CN élongation NH déformation
Amide IV	625-767	OCN déformation
Amide V	640-800	NH déformation hors du plan
Amide VI	537-606	C=O déformation hors du plan
Amide VII	200	Torsion du squelette

Tableau 10 – Bandes de vibration associées à une fonction amide

La présence de structuration secondaire, stabilisée par des liaisons non covalentes de type liaisons hydrogène, va pouvoir être mise en évidence par l'observation de deux bandes vibrationnelles principales : la bande Amide I et la bande Amide A.

a- Amide I

La région du spectre la plus sensible au phénomène de structuration secondaire est la bande Amide I, qui correspond à la bande de vibration d'élongation de la liaison C=O de la liaison peptidique. Chaque type de structuration secondaire va générer une fréquence de vibration différente, due en particulier à une géométrie tridimensionnelle unique et aux liaisons hydrogène mises en jeu. Ainsi, un groupe de chercheurs, travaillant sur des protéines dans H₂O et D₂O, a mis en évidence une certaine corrélation entre la fréquence de la bande Amide I et le type de structuration adopté par les protéines.²⁰⁷

H ₂ O [†]		D ₂ O [‡]	
Mean frequencies	Assignment	Mean frequencies	Assignment
1624±1.0	β-sheet	1624±4.0	β-sheet
1627±2.0	β-sheet		
1633±2.0	β-sheet	1631±3.0	β-sheet
1638±2.0	β-sheet	1637±3.0	β-sheet
1642±1.0	β-sheet	1641±2.0	3 ₁₀ Helix
1648±2.0	Random	1645±4.0	Random
1656±2.0	α Helix	1653±4.0	α-Helix
1663±3.0	3 ₁₀ Helix	1663±4.0	β-Turn
1667±1.0	β-Turn	1671±3.0	β-Turn
1675±1.0	β-Turn	1675±5.0	β-sheet
1680±2.0	β-Turn	1683±2.0	β-Turn
1685±2.0	β-Turn	1689±2.0	β-Turn
1691±2.0	β-sheet	1694±2.0	β-Turn
1696±2.0	β-sheet		

Tableau 11 – Corrélation entre nombre d’onde et structuration secondaire

b- Amide A

Par ailleurs, il est connu que lorsque la vibration d’une liaison NH (Amide A) est perturbée par quelque interaction ou par son implication dans une liaison hydrogène, la fréquence d’élongation de cette liaison se trouve diminuée. En opérant en solution très diluée dans un solvant inerte, les molécules d’échantillon ne seront ni agrégées ni en interaction avec le solvant. Il sera donc possible de distinguer deux zones dans la région Amide A : une zone de plus basse fréquence correspondant aux bandes des liaisons NH engagées dans des liaisons hydrogène et une zone correspondant aux bandes vibrationnelles des liaisons NH libres.²⁰⁸

A titre d’exemple, on peut citer les travaux de Seebach et coll. qui ont étudié l’évolution du spectre IR en solution dans le chloroforme (concentration 5 mM) d’une série de β^{2,2}-oligomères dérivant de l’acide 1-(aminométhyl)cyclopropane-carboxylique.⁵² Les auteurs ont montré que l’hexamère de cette série se repliait en hélice H-8.

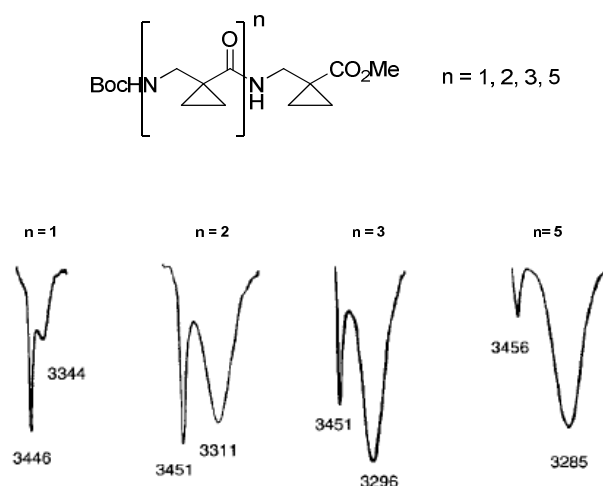


Figure 66 – Evolution du profil IR (zone des NH) pour une série d'oligomères

On observe une évolution nette au niveau des bandes NH Amide A. Le dimère ($n = 1$) présente deux bandes distinctes : une bande de forte intensité à 3446 cm^{-1} correspondant à l'élongation d'une liaison NH libre et une bande beaucoup plus faible à 3344 cm^{-1} . Cette dernière bande suggère la présence de liaisons hydrogène faible. Au fur et à mesure que la chaîne peptidique s'allonge, cette deuxième bande voit sa fréquence diminuer et son intensité augmenter. Ceci traduit typiquement la présence de liaisons hydrogène de plus en plus fortes.

4- Diffraction des rayons X

Les méthodes de diffraction, qui englobent la diffraction des rayons X, des neutrons (ND) et des électrons (ED) sont des techniques qui fournissent les informations les plus détaillées sur la structure tridimensionnelle d'une molécule. La diffraction des rayons X, plus particulièrement, est une technique d'analyse qui est réalisée à l'état solide, contrairement à toutes les techniques présentées précédemment. Elle est appliquée à l'étude de structures cristallines dont la taille peut descendre jusqu'à 10^{-4} cm^3 . Cette méthode nécessite donc l'obtention de cristaux de la molécule, ce qui peut souvent être un obstacle, toutes les molécules ne cristallisant pas.

Les limitations de l'analyse par diffraction des rayons X résultent, d'une part, de la nécessité d'avoir un monocristal de la molécule étudiée et, d'autre part, du fait que les résultats obtenus ne représentent pas ceux d'une molécule isolée mais ceux de molécules sur lesquelles les forces du cristal s'appliquent.

A titre d'exemple, on peut citer les travaux de Gellman et col. qui ont obtenu des structures cristallines de deux β -peptides : un octamère dérivé du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACPC⁶¹ et le tétramère dérivant du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACHC : ⁶⁰

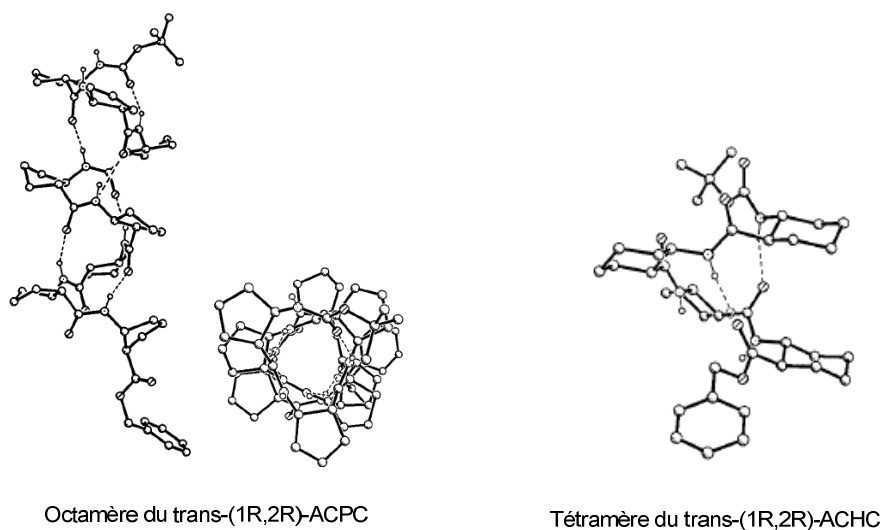


Figure 67 – Structures cristallines de β -peptides

Pour ces deux molécules, l'analyse par diffraction des rayons X a mis en évidence les similitudes de la structuration secondaire à l'état solide et en solution : le tétramère du *trans*-ACHC se replie en hélice H-14 et l'octamère du *trans*-ACPC en hélice H-12.

5- Modélisation moléculaire

La modélisation est devenue une technique incontournable dans l'étude des structurations secondaires de peptides et des protéines. En effet, elle permet d'accéder à des populations de conformations parmi lesquelles se trouve la conformation la plus stable, celle qui présente un minimum global d'énergie. Une étude par modélisation moléculaire peut se limiter à des calculs théoriques, avec ou sans contraintes théoriques imposées, mais elle peut aussi être menée en incluant des paramètres expérimentaux (angles dièdres, distances interatomiques issus d'expérience de RMN...) qui ont pour but de diminuer l'étendue de l'espace conformationnel. On appelle espace conformationnel l'ensemble des conformations que peut adopter une molécule.

On trouve principalement trois approches appliquées à l'étude de l'espace conformationnel d'une molécule de haut poids moléculaire.

❖ **La dynamique moléculaire**

Cette méthode permet d'explorer l'espace conformationnel d'une molécule en appliquant les principes de la mécanique classique. Elle permet d'accéder rapidement aux populations de conformations après des calculs impliquant ou non des contraintes extérieures.

❖ **Recuit simulé**

Le recuit simulé entre dans la catégorie des méthodes de dynamique moléculaire. Cette technique permet d'accéder à la conformation de minimum global d'énergie en agissant sur la température et avec ou sans contraintes extérieures. La molécule est soumise à un cycle comprenant deux principales phases : une phase d'augmentation de la température et une phase de refroidissement lent. A l'issue de ce cycle, on obtient la conformation de minimum global d'énergie.

❖ **Monte-Carlo**

Cette méthode permet de générer aléatoirement un ensemble de conformations au départ d'une structure donnée. Cette méthode procède par cycle itératif. En effet, à chaque nouvelle conformation trouvée, si l'énergie potentielle de celle-ci est inférieure à l'énergie potentielle de la structure de départ, elle est alors considérée comme une nouvelle conformation de départ pour l'étape suivante. Cette approche permet de s'affranchir de la barrière d'énergie potentielle et permet ainsi d'accéder à la conformation de minimum global d'énergie.

De manière générale, de nos jours, la plupart des groupes de chercheurs travaillant à l'étude de structurations secondaires de β -peptides incluent une étude par modélisation moléculaire. Dans la majorité des cas, ces études sont conduites sous contraintes extérieures (RMN).

II- Analyse conformationnelle – Série « azoture »

1- Etude des oligomères

a- RMN

La RMN est la technique de choix, au cœur du processus de recherche conformationnelle. Elle permet d'établir des hypothèses qui peuvent être ensuite complétées par des données issues d'autres techniques.

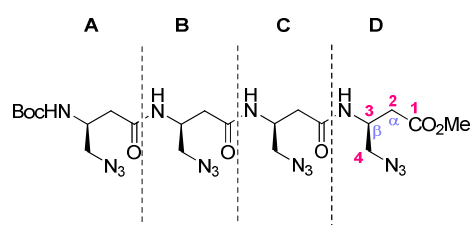
Un préalable incontournable est l'attribution la plus complète possible des signaux des protons et des carbones qui composent la chaîne peptidique, mais également, si possible, des chaînes latérales qui peuvent donner des informations supplémentaires notamment en termes de distance issues d'effets nOe par exemple.

Il est donc crucial de trouver le meilleur solvant possible qui allie une bonne solubilité de l'ensemble des oligomères d'une série avec une bonne dispersion des différents signaux de la chaîne peptidique. Dans notre cas plus particulièrement, nous nous intéresserons aux zones des NH d'amide, des C_αH et des C_βH. On l'a vu, une bonne dispersion des signaux est, la plupart du temps, le signe qu'un oligomère adopte une structuration secondaire particulière. Nous avons testé différents solvants deutérés: le chloroforme CDCl₃, le méthanol-d₄ CD₃OD, le méthanol-d₃ CD₃OH, la pyridine-d₅ C₅D₅N et un mélange CD₃OD/C₅D₅N. A l'issue de ces essais, nous avons retenu le méthanol-d₃. C'est le solvant qui offre le meilleur compromis entre solubilité et dispersion des signaux. L'hexamère protégé à ses extrémités N- et C-terminales **94** présente une solubilité médiocre dans le méthanol-d₃, ne permettant pas l'enregistrement de spectres de bonne qualité. En revanche, son analogue déprotégé à l'extrémité N-terminale **95** est plus soluble et la bonne dispersion des signaux est maintenue.

Le pic résiduel de l'eau dans le méthanol-d₃ étant très important, il a été nécessaire d'effectuer une présaturation de ce signal. Toutes les analyses (1D et 2D) dans CD₃OH ont été effectuées sur un spectromètre 500MHz.

❖ Numérotation

La numérotation des atomes des molécules de la série « azoture » est résumée sur le schéma suivant en prenant pour exemple le tétramère **92**.



Résidus : notés A, B, C... à partir de l'extrémité *N*-terminale

Carbones et protons:

- notés C_α et C_β dans le cadre de l'analyse conformationnelle
- notés 1,2,3... pour la description RMN (partie expérimentale)

Ex : le proton porté par le carbone C_β du résidu A sera noté $C_\beta H_A$ pour l'analyse conformationnelle et H_{3A} lors de l'attribution des signaux dans la partie expérimentale

Figure 68 – Numérotation pour la série « azoture »

i- Etude des spectres RMN 1D

Tous les oligomères ont été attribués le plus complètement possible malgré les recouvrements de signaux. Pour ce faire, nous avons utilisé une combinaison de différentes expériences de RMN à 2 dimensions (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY). La Figure 69 présente les spectres 1H du trimère **91**, du tétramère **92** et de l'hexamère protégé **94** et de l'hexamère déprotégé au niveau de l'extrémité *N*-terminale **95** dans le méthanol- d_3 .

Le tableau suivant (Tableau 12) récapitule les déplacements chimiques des protons d'amide NH pour chaque oligomère. Les constantes de couplage $^3J(NH, C_\beta H)$ sont précisées entre parenthèses, les autres constantes de couplage n'ayant pas pu être déterminées. Dans tous les cas, nous avons attribué les signaux de la façon la plus complète possible mais les deux protons $C_\alpha H$ (ProR et ProS) n'ont pas pu être différenciés du fait de la superposition des signaux correspondants.

Oligomère	Résidu A	Résidu B	Résidu C	Résidu D	Résidu E	Résidu F
Trimère 91	6,74 (8,3 Hz)	8,08 (8,1 Hz)	8,24 (8,0 Hz)	-	-	-
Tétramère 92	6,79 (8,5 Hz)	8,07 (8,1 Hz)	8,13 (8,0 Hz)	8,24 (8,0 Hz)	-	-
Hexamère 94	6,89	7,71(1H) – 8,00 (2H) – 8,11(2H)				
Hexamère 95 (sel de TFA)	-	7,65(9,0 Hz) – 8,03(9,1 Hz) – 8,12(8,8 Hz) – 8,26(8,7 Hz) –			8,32(8,3 Hz)	

Tableau 12 – Déplacements chimiques et constantes de couplage $^3J(NH, C_\beta H)$ pour les oligomères de la série « azoture » dans CD_3OH

De façon générale, les spectres 1H du trimère **91** et du tétramère **92** présentent une bonne dispersion des signaux dans la zone des NH (Figure 69). Les protons NH_A (carbamate)

de ces deux oligomères présentent des déplacements chimiques similaires, naturellement différents des protons d'amide.

Si on compare les valeurs des déplacements chimiques des protons NH avec les données de la littérature,²⁰⁹ ces valeurs sont un peu faibles pour affirmer que ces protons sont engagés dans des liaisons hydrogènes fortes. Tout au plus, ils correspondent à des liaisons hydrogène intramoléculaire de faible intensité. En tout état de cause, dans CD₃OH, à la différence de CDCl₃, il n'est pas évident de statuer sur l'implication de protons NH sur la seule base de leurs déplacements chimiques.

C'est au stade de l'hexamère que l'on trouve les informations les plus intéressantes. Malgré une mauvaise qualité de spectre due à sa faible solubilité qui rend impossible l'attribution des signaux, on observe une très bonne dispersion dans la zone des C_αH, et un profil de la zone des NH différent du trimère et du tétramère mais toujours aussi éclaté. Ces deux observations laissent envisager la présence d'une préférence conformationnelle au niveau de l'hexamère que l'on n'observe pas pour les oligomères plus courts. La meilleure solubilité de l'hexamère déprotégé **95** permet l'enregistrement d'un spectre de bien meilleure qualité, présentant une très bonne dispersion des signaux dans la zone des NH et des C_αH. L'éclatement des signaux dans la zone des C_βH n'est cependant pas optimal. L'étude de la zone des NH est particulièrement intéressante. On observe bien les signaux des cinq protons d'amide, très bien séparés. Les valeurs des déplacements chimiques de certains protons NH (8,12 – 8,26 – 8,32 ppm) sont cohérentes avec l'engagement de ces protons dans des liaisons hydrogène, en particulier le proton à 8,32 ppm. De plus, certaines constantes de couplage ³J(NH,C_βH) présentent des valeurs (9,0 et 9,1 Hz) qui peuvent correspondre localement à un arrangement antipériplanaire des protons NH et C_βH concernés.

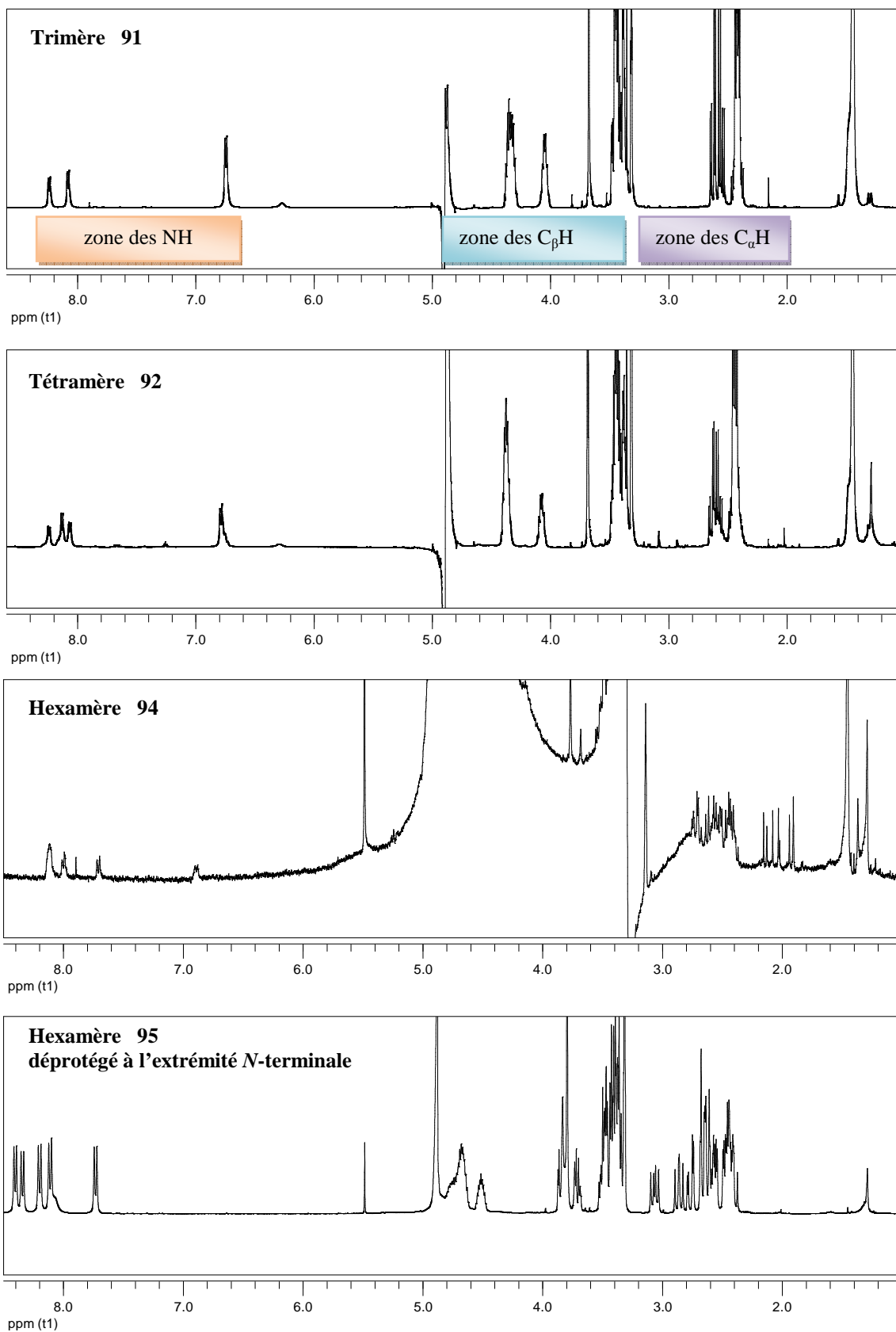


Figure 69 – Spectres ^1H (500 MHz) des oligomères de la série « azoture » dans CD_3OH

❖ Tétramère

Dans le cas du tétramère **92**, on constate la présence d'épaulements au niveau de certains protons, notamment des NH, des C_αH et des protons de l'ester méthylique et du groupement Boc (Figure 70).

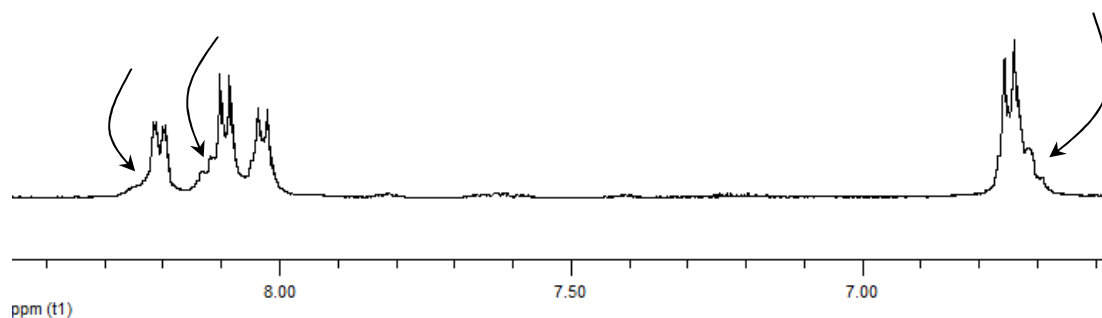


Figure 70 – Zone des NH du tétramère 92

Afin de statuer sur l'origine des épaulements observés, à savoir s'il s'agit d'une impureté ou d'une conformation stable minoritaire en équilibre, nous avons procédé à une expérience en température. Les spectres, enregistrés à 25°C, 30°C, 40°C, 50°C et 60°C sont représentés sur la figure suivante (Figure 71).

On peut observer une disparition progressive des épaulements avec l'augmentation de la température. De même, on observe une simplification des signaux dans la zone des C_αH. Ceci tend à montrer que la RMN révèle la présence de deux conformations dont l'une reste minoritaire. En effet, si on avait été en présence d'une impureté, une variation de température n'aurait pas dû avoir d'effet. D'autre part, le lot dont ce tétramère **92** est issu a été purifié par HPLC préparative en phase inverse, ce qui est un gage supplémentaire de pureté (HPLC > 99%).

L'expérience en température nous permet également d'étudier le comportement intrinsèque du tétramère en fonction de la température (Figure 72). L'amplitude des variations de déplacements chimiques fournit des informations sur l'implication des protons dans des liaisons hydrogène. De façon générale pour le tétramère, on peut constater un déplacement de l'ensemble des signaux des protons NH vers les champs forts. Le fait que tous les signaux voient leur déplacement chimique diminuer de manière significative semble indiquer une absence de structuration. En effet, dans le cas contraire, les protons engagés dans des liaisons hydrogène verraient leur déplacement chimique être légèrement modifié en fonction de la température. Il peut tout de même être intéressant de calculer leur coefficient de température. Pour cela, il suffit pour chaque NH de rapporter sur un graphe les valeurs des déplacements

chimiques en fonction de la température. La pente de chaque droite fournit le coefficient de température de chaque proton NH.

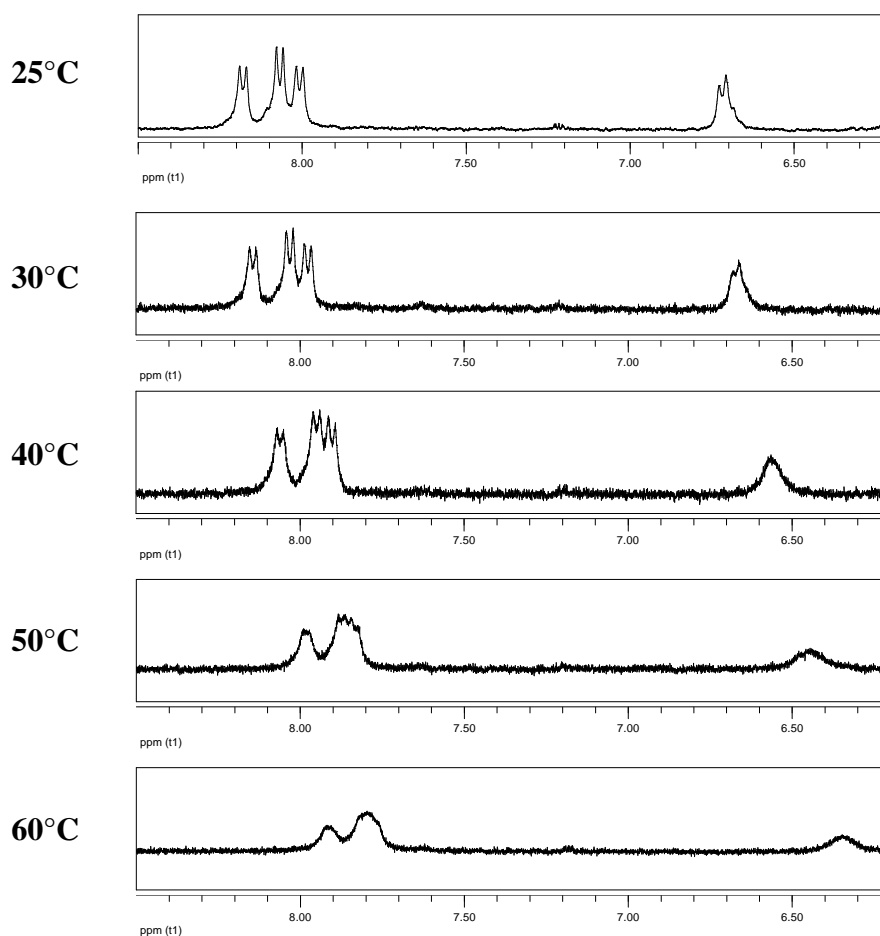


Figure 71 – Etude en température par RMN (400 MHz) du tétramère 92 dans CD₃OH

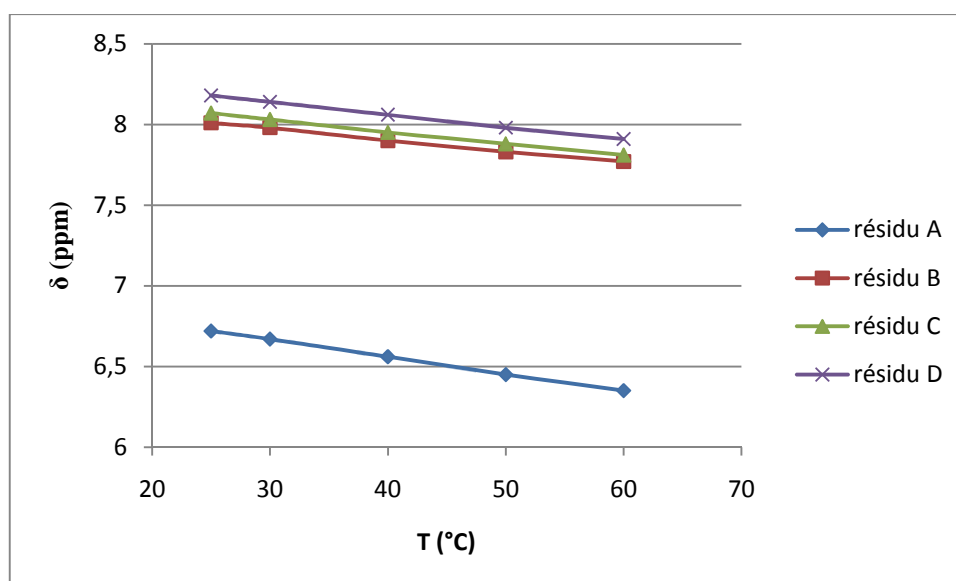


Figure 72 – Graphe δ (ppm) = f[T(°C)] pour le tétramère 92 dans CD₃OH

Les évolutions sont parfaitement linéaires (coefficients de corrélation des droites $R^2 \geq 0,997$). Les coefficients de température des différents protons NH sont reportés dans le tableau suivant.

	NH_A	NH_B	NH_C	NH_D
C. T. (ppb/°C)	-10,6	-6,9	-7,4	-7,7

Tableau 13 – Calcul des coefficients de température des NH du tétramère 92 dans CD₃OH

Ainsi, les coefficients de température des différents protons NH sont tous négatifs, ce qui est normal, mais ils sont tous inférieurs à -6 ppb/°C. Rappelons qu'il est admis que les protons dont le coefficient de température est supérieur à -6 ppb/°C sont susceptibles d'être engagés dans des liaisons hydrogène. Dans notre cas, le proton NH_A présente un C.T. très éloigné des autres, ce qui met en évidence le comportement bien différent d'un proton NH de carbamate en comparaison avec les NH d'amide. Les protons NH_B, NH_C et NH_D ont des coefficients de température proches mais inférieurs à la valeur charnière. Cette observation, corrélée aux valeurs des déplacements chimiques de ces protons à température ambiante pourrait laisser supposer qu'ils ne sont pas engagés dans des liaisons hydrogène.

Il semblerait donc qu'on soit plutôt en présence d'un équilibre entre plusieurs conformations dont deux seraient plus stables que les autres, mais apparemment pas stabilisées par liaisons hydrogène.

ii- Etude des corrélations dipolaires (effets nOe)

❖ Tétramère 92

L'expérience de NOESY a été réalisée avec un temps de mélange de 500ms. Les corrélations auxquelles nous nous intéressons plus particulièrement peuvent être classées en trois catégories et sont définies sur la carte 2D suivante :

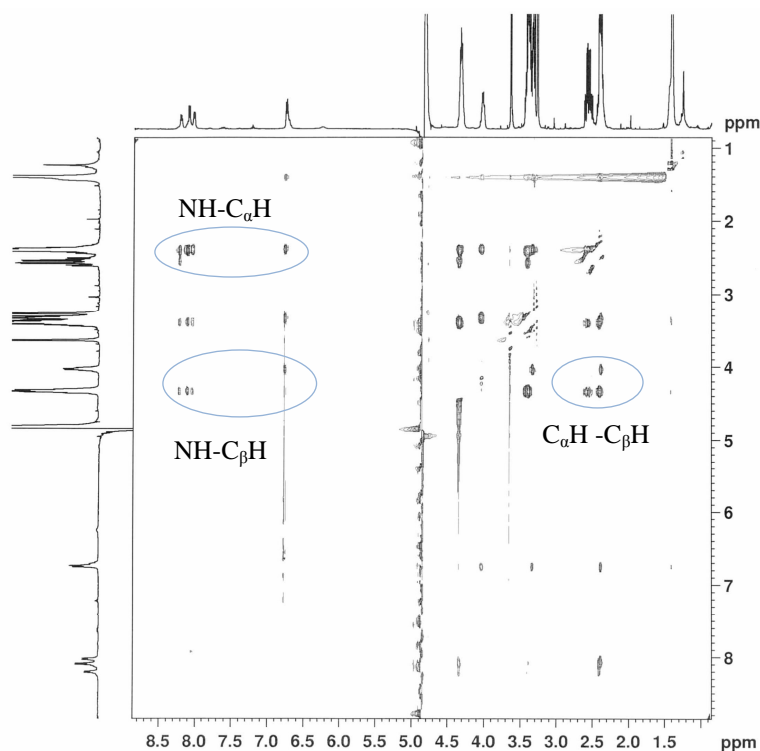


Figure 73 – Carte de NOESY (500 MHz) du tétramère 92 dans CD₃OH

L'étude des différentes zones de la carte 2D va nous permettre de voir précisément les corrélations dipolaires existant au sein du tétramère 92.

❖ *Zone NH-C_αH*

Un agrandissement de la zone de corrélation dipolaire NH-C_αH est représenté sur la Figure 74.

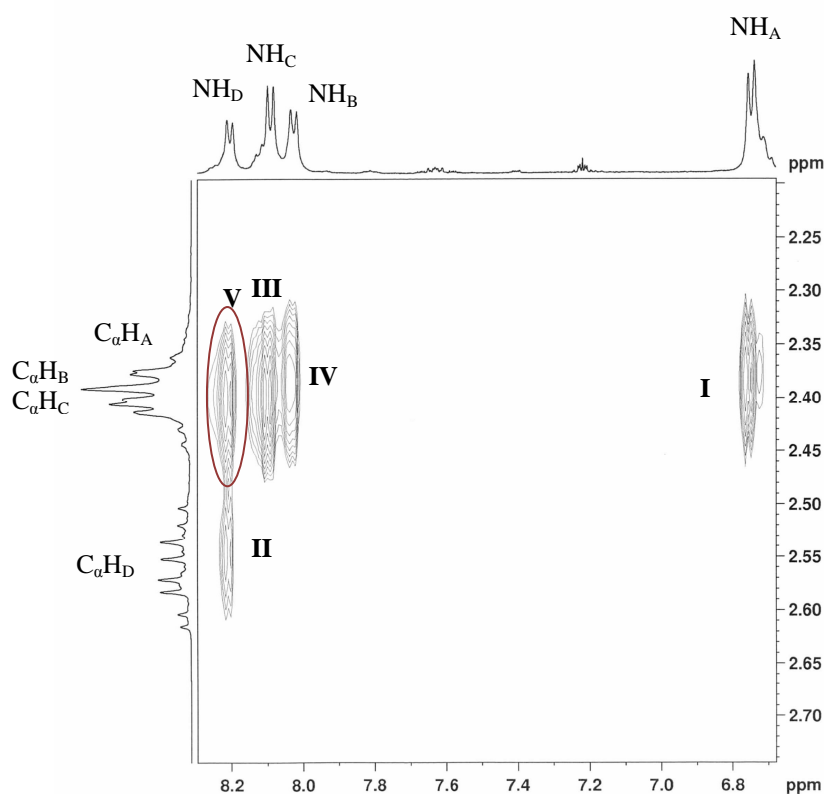


Figure 74 – Zone de corrélation NH-C_αH

Les tâches de corrélation **I**, **II**, **III** et **IV** de forte intensité correspondent à des nOe à courte distance, de type NH_i-C_αH_i au sein d'un même résidu. En revanche, la tâche **V** correspond à une corrélation nOe de type NH_i-C_αH_{i-1} ou NH_i-C_αH_{i-2}. Le recouvrement des signaux C_αH_B et C_αH_C rend impossible toute distinction entre les deux résidus.

❖ *Zone NH-C_βH*

La zone de corrélation NH-C_βH est représentée sur la Figure 75.

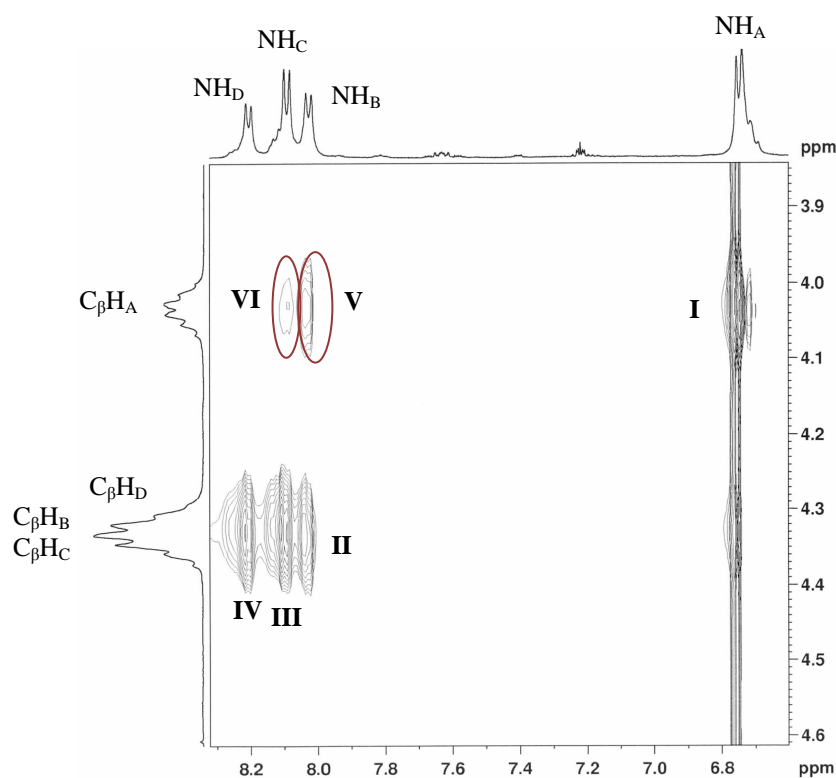


Figure 75 - Zone de corrélation NH-C_βH

Les tâches de corrélation **I**, **II**, **III**, **IV** de forte intensité représentent des nOe de type NH_i-C_βH_i un sein d'un même résidu. Les tâches **V** et **VI**, en revanche, correspondent à des corrélations inter-résidu. La tâche de corrélation **V** de moyenne intensité correspond à un nOe de type NH_i-C_βH_{i-1} (NH_B ↔ C_βH_A). On observe également un nOe de faible intensité de type NH_i-C_βH_{i-2} (NH_C ↔ C_βH_A). Cette dernière corrélation, bien que de faible intensité dénote une certaine proximité spatiale de ces deux protons, ce qui suggère un début de repliement de la molécule.

❖ *Zone C_αH- C_βH*

Cette zone n'est pas informative puisque les seules tâches observées correspondent à des corrélations intra-résidu.

Conclusion

Les différentes corrélations nOe observées sont résumées sur la Figure 76. Les corrélations pour lesquelles un doute subsiste sont représentées en pointillés.

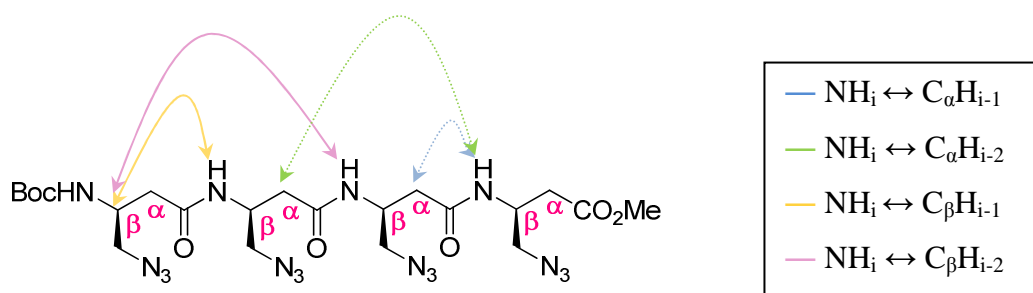


Figure 76 – Corrélations nOe inter-résidus observées sur le tétramère 92 dans CD₃OH

b- Infrarouge

Afin d'apporter des preuves supplémentaires aux observations faites à l'issue des expériences de RMN 1D et 2D et de dichroïsme circulaire, nous avons entrepris une étude de la série d'oligomères par spectroscopie infrarouge. Comme évoqué précédemment, ceci devrait nous permettre de mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires.

Le spectre de chaque composé C est obtenu par traitement informatique par soustraction du spectre du solvant pur S au spectre de l'échantillon C+S.

$$\text{spectre}(C) = \text{spectre}(C + S) - \text{spectre}(S)$$

Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme, de qualité spectroscopique (Acros Organics), stabilisé avec de l'amylène et non pas avec de l'éthanol dont la bande OH proche de celles des NH, qui nous intéressent, rend difficile la soustraction du spectre du solvant. Nous avons également testé l'acétonitrile qui ne nous a pas permis d'obtenir des spectres de qualité.

Les échantillons ont donc été préparés par dissolution dans le chloroforme à des concentrations connues. La concentration usuellement utilisée dans la littérature est de 2 mM. Il a cependant été nécessaire de préparer des échantillons beaucoup plus dilués pour le tétramère 92 et l'hexamère 94 du fait de leur très faible solubilité dans le chloroforme.

Oligomère	Concentration (mM)
Monomère 85	7,3
Dimère 88	2,0
Trimère 91	1,3
Tétramère 92	0,3
Hexamère 94	0,2

Tableau 14 – Préparation des échantillons

A l'issue de ces expériences, on obtient les spectres des différents oligomères qui sont superposés afin de mettre en évidence une éventuelle évolution.

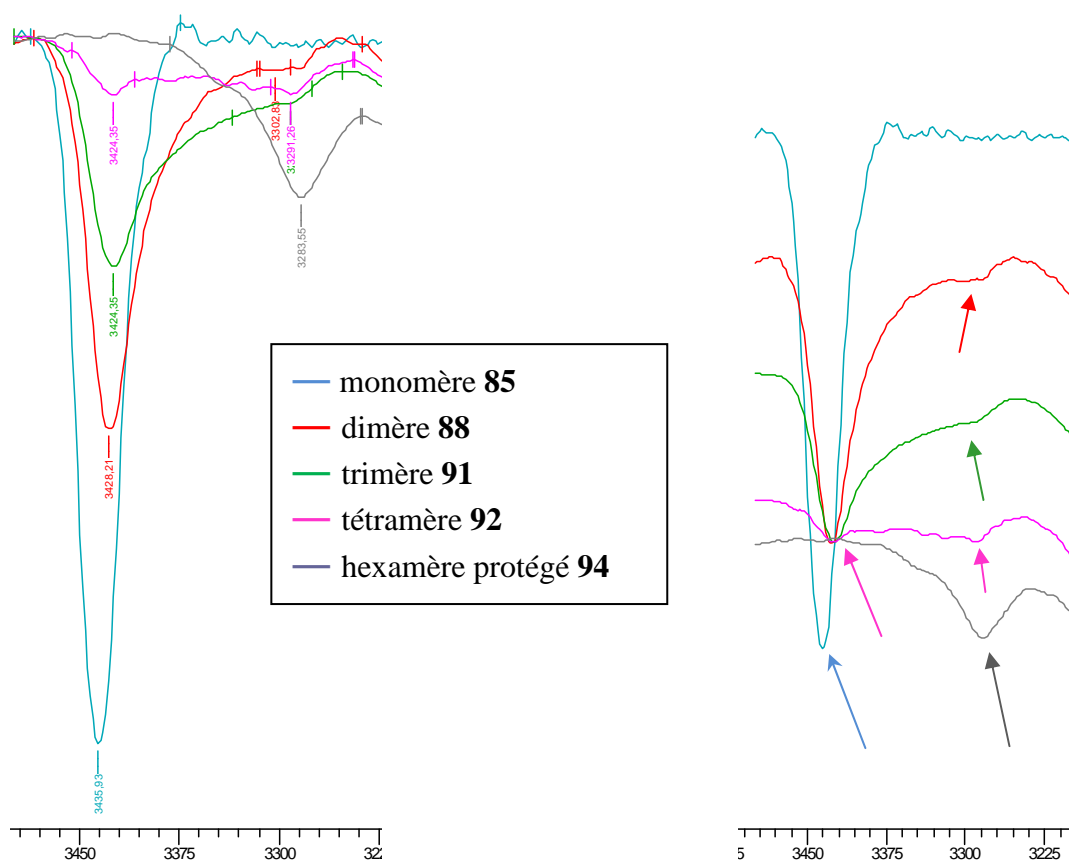


Figure 77 – Spectre IR (zone de vibration des liaisons NH) de la série « azoture »

On constate une nette évolution de l'allure des spectres avec l'élongation de la chaîne. Pour le monomère **85**, on observe une bande unique à 3435 cm^{-1} qui correspond à la vibration de la bande NH de l'amine protégée sous forme de carbamate. Dès le dimère, on constate l'apparition d'un épaulement à 3302 cm^{-1} . Avec l'allongement de la chaîne, on observe une

disparition progressive de la bande vers 3400 cm^{-1} au profit d'une augmentation de l'intensité de l'épaulement. Le spectre du tétramère **92** montre la présence simultanée de deux bandes d'égale intensité à 3427 cm^{-1} et 3319 cm^{-1} , ce qui laisse suggérer la présence de deux environnements différents : le premier au dessus 3400 cm^{-1} correspondant aux liaisons NH dont le proton n'est pas engagé dans les liaisons hydrogène et le second au dessous de 3400 cm^{-1} correspondant aux liaisons NH dont le proton est engagé dans des liaisons hydrogène. On arrive finalement à une unique bande à 3284 cm^{-1} dans le cas de l'hexamère **94**. Ce profil de bande unique, combiné à la valeur de la fréquence de cette bande, met en évidence la présence d'une structuration ordonnée de l'hexamère mettant en jeu des liaisons hydrogène. On peut cependant s'étonner de ne pas observer de bande résiduelle au dessus de 3400 cm^{-1} .

c- Dichroïsme Circulaire

L'ensemble de la série « azoture » a été étudié par dichroïsme circulaire à 20°C dans deux solvants différents, transparents dans la gamme d'absorption UV considérée. Le premier solvant utilisé a été le trifluoroéthanol (TFE). C'est un solvant de choix pour les expériences de dichroïsme circulaire puisqu'il est connu pour favoriser l'établissement de conformations ordonnées en diminuant la constante diélectrique du milieu. Le méthanol a été utilisé dans un deuxième temps afin de corréliser au mieux les résultats de DC et de RMN. Les échantillons sont préparés par dilution de solutions concentrées afin de limiter les incertitudes liées à la pesée des composés.

La superposition des courbes correspondant à chaque oligomère, enregistrées dans le TFE, est représentée sur la Figure 78.

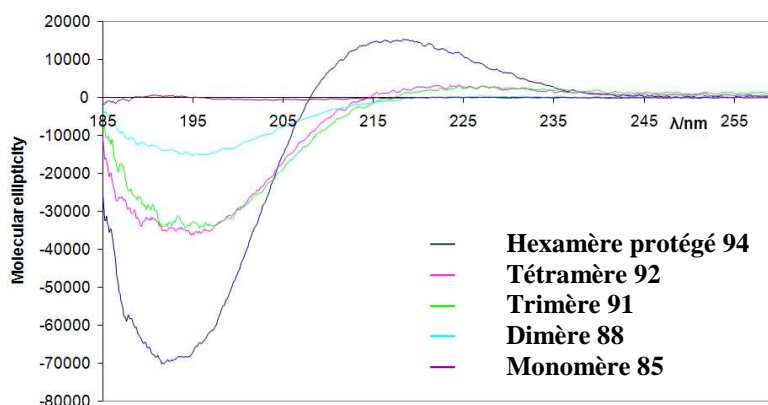


Figure 78 – Spectres de dichroïsme circulaire des oligomères de la série « azoture » dans le TFE – monomère (197,9 μ M), dimère (100,0 μ M), trimère et tétramère (50,0 μ M) et hexamère (45,0 μ M)

Le dimère, trimère et tétramère présentent le même profil de courbe de DC, caractérisé par un faible effet *Cotton* centré à 225 nm et un maximum intense à 195 nm. Le spectre de l'hexamère est très différent. On observe une bande positive intense centrée à 217 nm et un fort effet *Cotton* est observé à 190 nm. De telles différences suggèrent une préférence conformationnelle différente entre l'hexamère et les oligomères plus courts. Le spectre de DC de l'hexamère ressemble au profil caractéristique de β -peptides dans le méthanol structuré en hélice H-14, d'hélicité gauche.^{206,210,211}

Afin d'étudier de façon plus approfondie la préférence conformationnelle de l'hexamère, les spectres ont été normalisés par rapport au nombre de résidus (Figure 79). Dans le cas particulier des peptides, ceci permet de mettre en évidence l'ellipticité propre de chaque résidu et, dans certains cas, de montrer l'existence d'un effet coopératif.

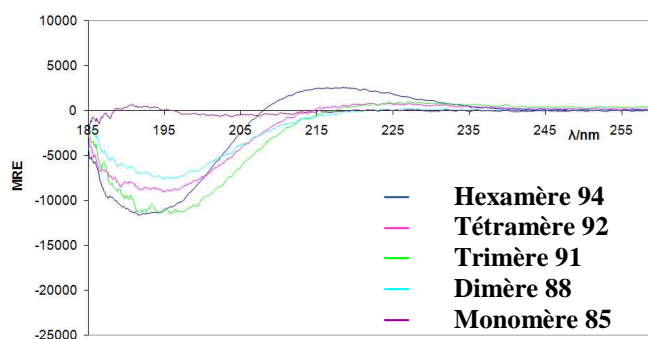


Figure 79 – Spectres de dichroïsme circulaire par résidu (MRE) dans le TFE

Les spectres ainsi normalisés montrent clairement une transition conformationnelle qui augmente avec l'allongement de la chaîne peptidique. Le dimère, trimère et tétramère adoptent des conformations similaires, reliées entre elles par une interconversion conformationnelle, comme le suggère la présence de points isodichroïques (dimère/trimère à ~ 213 nm et dimère/tétramère à ~ 208 nm). L'hexamère montre une signature de DC significativement différente de celles des oligomères plus courts.

On remarque que la MRE du tétramère est plus faible que celle observée pour le trimère suggérant ainsi une conformation moins stable pour le tétramère que pour le trimère.

Les spectres de DC des oligomères ont été enregistrés dans le méthanol afin de corréler les résultats obtenus avec les observations faites lors de l'étude par RMN. Seuls les spectres du dimère, trimère et tétramère ont pu être enregistrés du fait de la faible solubilité de l'hexamère dans le méthanol.

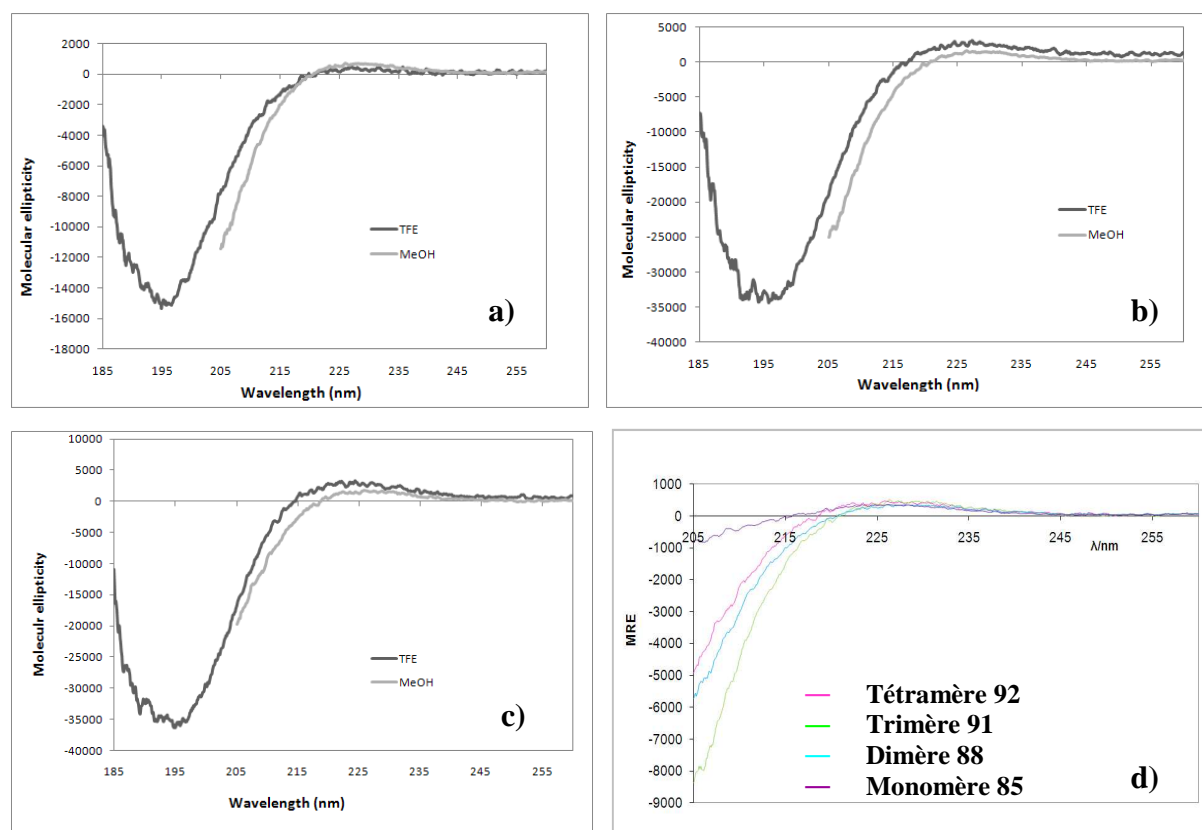


Figure 80 – Spectres enregistrés dans le TFE et dans le méthanol pour a) dimère, b) trimère et c) tétramère – d) Spectres de dichroïsme circulaire par résidu (MRE) dans le méthanol

Tous les composés étudiés dans le méthanol montrent un spectre de DC semblable à celui obtenu dans le TFE, caractérisé par un faible effet *Cotton* centré à 225 nm et une bande négative intense centrée en dessous de 205 nm (Figure 80 a), b) et c)). On observe également

un très léger décalage des courbes (environ 3 – 6 nm) dans le méthanol. L'analyse n'a pas pu être effectuée en dessous de 205 nm à cause de l'absorbance intrinsèque du solvant. Afin d'établir la stabilité conformationnelle comme fonction de la longueur de la chaîne, les spectres ont été normalisés (Figure 80 d)). Ceci permet de constater, comme précédemment dans le TFE, que ces trois oligomères présentaient une préférence conformationnelle semblable. De plus, avec l'allongement de la chaîne peptidique entre le dimère et le trimère, on observe une augmentation de la population de molécules adoptant la même conformation. En d'autres termes, la conformation observée pour le trimère est plus stabilisée que dans le dimère. De façon surprenante, le tétramère présente une MRE inférieure à celle du dimère et du trimère, ce qui est indicatif d'une stabilité conformationnelle plus faible dans le cas du tétramère : la (les) conformation(s) observée(s) pour le dimère et le trimère se trouvent déstabilisées dans le tétramère. Ceci est à mettre en relation avec les observations faites lors de l'étude du tétramère par RMN. Des épaulements avaient été observés sur le spectre ^1H et l'étude en température avait suggéré que ces derniers représentaient deux conformations stables dont une est majoritaire.

Afin d'étudier la nature de la conformation observée pour l'hexamère, ainsi que sa stabilité et les forces mises en jeu lors du processus de repliement, un dosage par H_2O ainsi qu'une étude en température ont été menées.

❖ Etude en température dans le TFE

Les spectres de DC de l'hexamère **94** ont été enregistrés à différentes températures comme le montre la Figure 81.

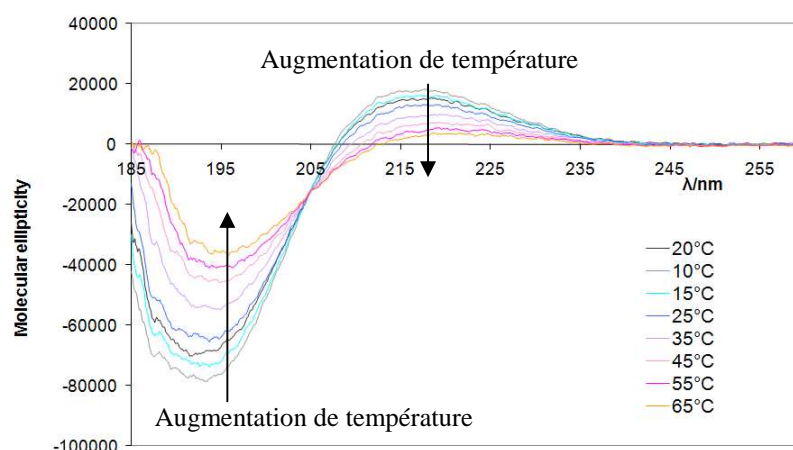


Figure 81 - Etude en température de l'hexamère 94 (45,0 μM) dans le TFE

Une augmentation de la température entraîne une diminution linéaire de l'ellipticité molaire à 195 nm et 215 nm, ce qui indique une augmentation de la flexibilité de la molécule mais globalement, la nature de la conformation reste inchangée. Il est intéressant de constater qu'avec l'augmentation de la température le profil des courbes reste le même, ce qui montre clairement qu'il n'y a pas de changement important au niveau de la préférence conformationnelle de l'hexamère. On observe cependant un très léger décalage des courbes entre 10°C et 65°C (minimum négatif ~ 192 nm → ~195 nm et maximum positif ~ 216 nm → ~220 nm).

❖ Titration par H₂O dans le TFE

La Figure 82 présente les spectres de DC de l'hexamère obtenus après variation de la proportion d'eau dans l'échantillon, de 0% à 70%. Les problèmes de solubilité de cet oligomère empêchent l'addition d'une quantité plus importante d'eau ainsi que l'utilisation du méthanol.

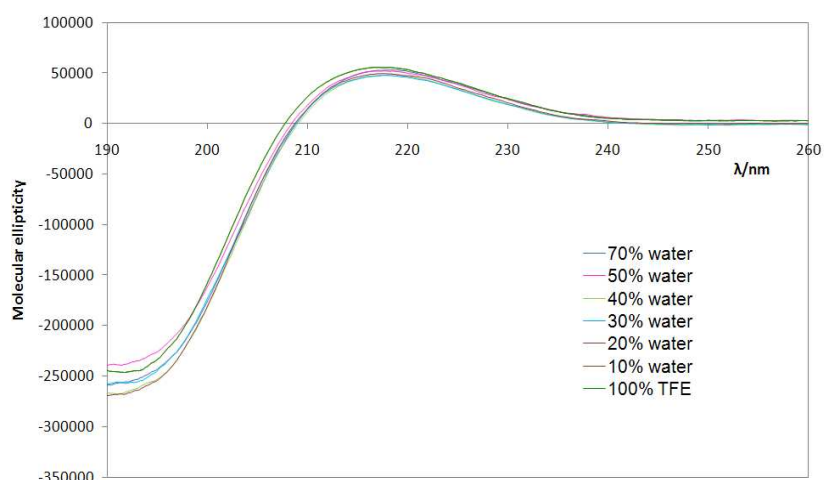


Figure 82 – Titration par H₂O dans le TFE pour l'hexamère 94 (20,0 μM)

Cette étude montre que la conformation adoptée par l'hexamère dans le TFE n'est pas affectée par la présence d'eau (jusqu'à 70%). Le maintien de la conformation observé ici contraste avec la perte de la structuration constatée par Seebach *et al.*²¹⁰ lors de titrations par H₂O dans le méthanol. Ainsi, dans notre cas, trois hypothèses peuvent être émises :

- la conformation observée n'est pas stabilisée par liaisons hydrogène. Nous serions donc en présence d'une hélice H-14, non stabilisée par liaisons hydrogène,
- la conformation est stabilisée par des liaisons hydrogène très fortes qui ne sont pas perturbées par l'addition d'eau,

- les liaisons hydrogène ne sont pas accessibles au solvant.

Conclusion

A ce jour, nous sommes en possession de plusieurs informations qui nous permettent de présumer de la présence d'une structuration secondaire au niveau de l'hexamère **94**. Malgré un spectre ^1H de très moyenne qualité dans le méthanol- d_3 , on peut observer une bonne dispersion des signaux, ce qui peut être le signe de la présence d'une structuration. Par ailleurs, tout en tenant compte du fait que le solvant utilisé était différent, l'étude par IR a mis en évidence un profil d'évolution caractéristique de l'établissement de liaisons hydrogène. L'étude par dichroïsme circulaire indique très clairement la présence d'une préférence conformationnelle marquée pour l'hexamère ; le profil de la courbe observée correspondrait à une structuration en hélice H-14. Cependant, la titration $\text{H}_2\text{O}/\text{TFE}$ sur l'hexamère **94** ne montre pas de modification importante, ce qui peut laisser à penser que la structuration adoptée ne serait pas stabilisée par liaisons hydrogène. Ceci prendrait tout son sens si on tient compte des résultats de l'étude en température sur l'hexamère qui montre une rapide perturbation de la structuration. Du fait de sa solubilité limitée, nous avons décidé de ne pas effectuer d'études plus poussées par RMN sur ce composé. Nous préférons analyser de manière plus approfondie son analogue **95** déprotégé au niveau de l'extrémité *N*-terminale dont le spectre ^1H semble d'ores et déjà très prometteur. Ce composé ayant été obtenu très récemment, nous n'avons pas en notre possession, à ce jour, l'ensemble des informations nécessaires permettant de statuer sur la nature de la conformation adoptée. Nous envisageons bien sûr, sur l'hexamère déprotégé **95**, de réaliser des études RMN (titration au DMSO et NOESY), couplées à des expériences de dichroïsme circulaire. L'ensemble de ces données devraient nous permettre, avec l'appui de la modélisation moléculaire, de déterminer la nature de la structuration secondaire.

2- Edifices glycoconjugués

a- RMN

L'introduction des unités saccharidiques sur les plateformes β -peptidiques a considérablement amélioré la solubilité des composés. Tous les composés glycoconjugués jusqu'à l'hexamère sont solubles dans le chloroforme. L'étude RMN de la série a donc été entièrement conduite dans CDCl_3 . Nous avons également enregistré les spectres ^1H des

composés glycoconjugués dans le méthanol- d_3 afin de pouvoir les comparer à ceux des oligomères seuls qui n'ont pu être effectués que dans CD_3OH du fait de leur faible solubilité dans d'autres solvants.

❖ Numérotation

De manière générale la numérotation des atomes des composés glycoconjugués est calquée sur celle des oligomères « azoture » non glycoconjugués (Figure 68Figure 83).

A titre d'exemple, nous présenterons uniquement le spectre de l'hexamère **172** dont le précurseur **94** avant conjugaison est, selon nous, structuré. La complexité du spectre (Figure 83), due à l'introduction des résidus saccharidiques et au recouvrement important de certains signaux, a rendu l'attribution impossible, excepté pour le résidu A. Est présenté également le spectre 1H dans D_2O de l'hexamère **177** dont les unités saccharidiques sont désacétylées.

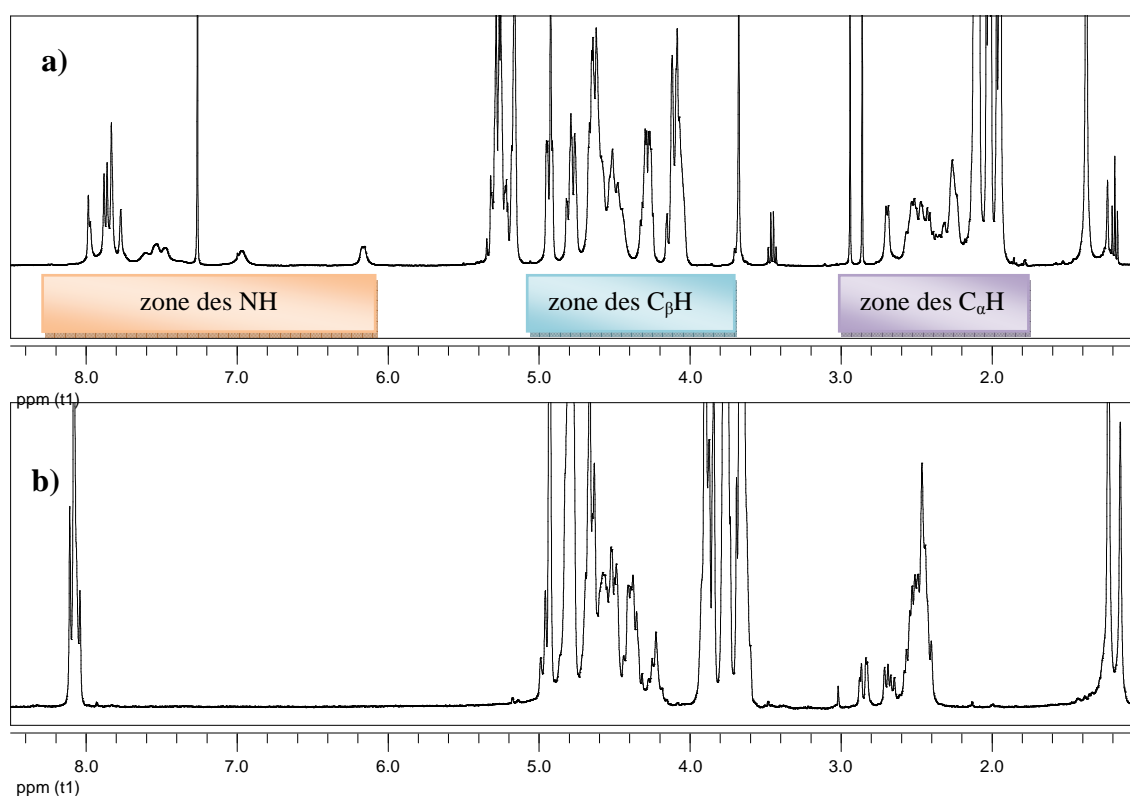


Figure 83 – a) Spectres 1H (400 MHz) a) de l'hexamère 172 dans $CDCl_3$ et b) de l'hexamère 177 présentant les sucres désacétylés dans D_2O

Le spectre dans $CDCl_3$ (Figure 83a)) présente toutefois une bonne dispersion au niveau de la zone des NH et on distingue une bonne dispersion au niveau des protons $C_\alpha H$ et $C_\beta H$ malgré le recouvrement avec certains signaux des unités saccharidiques. La zone des NH

s'étend de 6,17 ppm à 7,82 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des NH (I), (II), (III) et (IV) sont cohérentes avec une éventuelle implication de ces protons dans des liaisons hydrogène. En effet, au-delà de 7,2 ppm dans CDCl_3 , on considère généralement les protons comme impliqués dans des liaisons hydrogène.

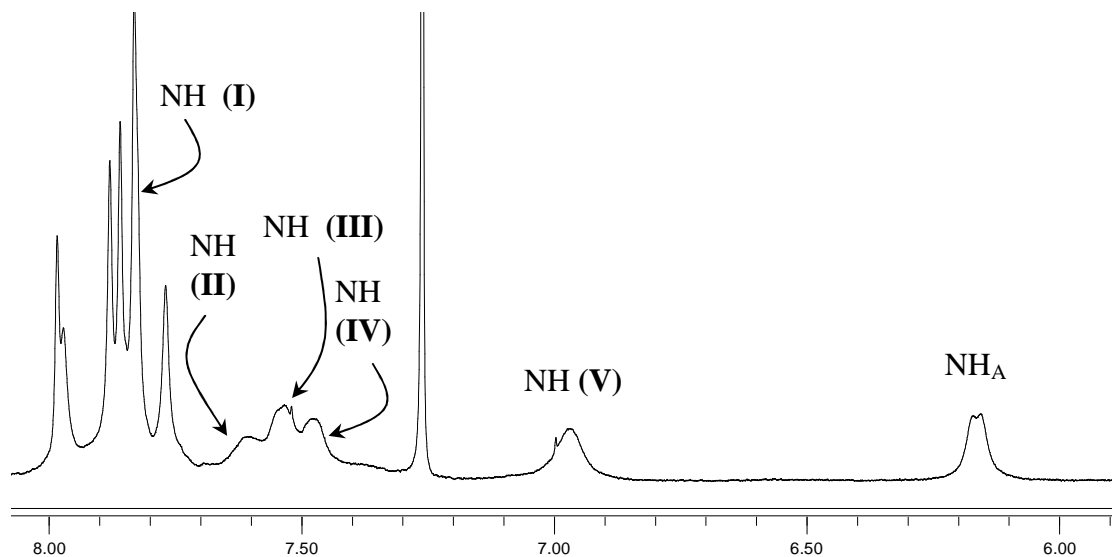
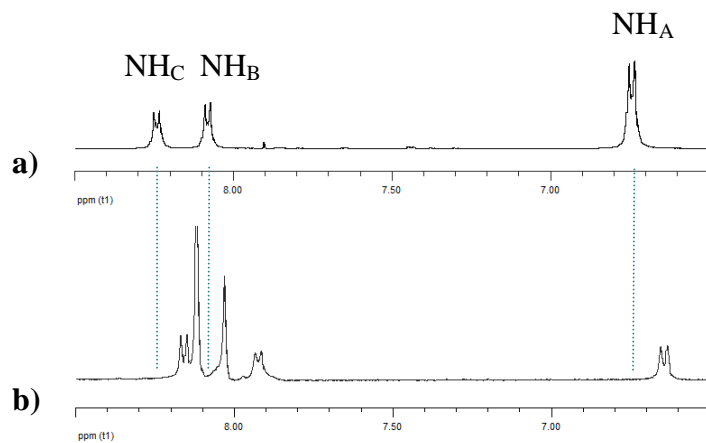


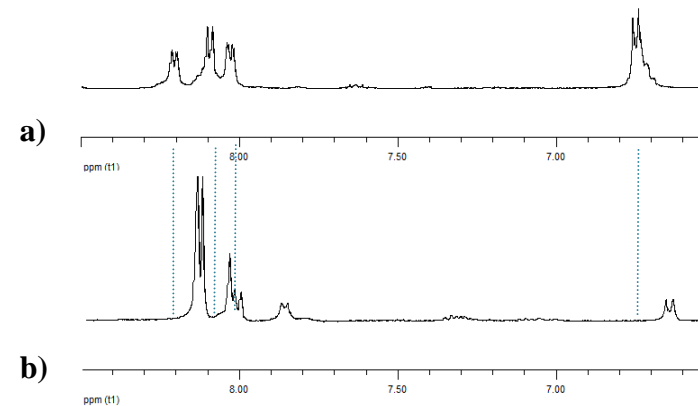
Figure 84 – Zone des NH d'amide de l'hexamère 172 dans CDCl_3

❖ Comparaison avec les oligomères non glycoconjugués

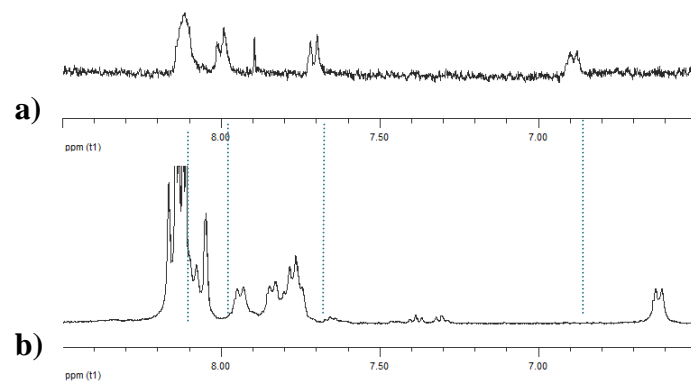
Les spectres ^1H de l'ensemble des composés glycoconjugués ont été enregistrés dans CD_3OH afin de les comparer avec les spectres ^1H des oligomères « $-\text{N}_3$ » précurseurs.



Superposition trimère **91** et
glycoconjugué **170**



Superposition tétramère **92** et
glycoconjugué **171**



Superposition hexamère **94** et
glycoconjugué **172**

Figure 85 – Comparaison des oligomères a) avant et b) après glycoconjugaison dans CD_3OH

De façon générale, on constate pour les trois composés glycoconjugués **170**, **171** et **172** un déplacement des signaux des NH vers les champs forts par rapport à ceux des oligomères « -N₃ » apparentés. Ceci suggère qu'une modification de l'état conformationnel est générée par l'introduction des unités saccharidiques. Dans le cas de l'hexamère **172**, les valeurs des déplacements chimiques des NH d'amide sont un peu basses, à l'exception de l'un d'entre eux, dont le signal, superposé avec ceux des protons des triazole vers 8,15 ppm, pourrait évoquer l'établissement de liaisons hydrogène.

b- Infrarouge

Nous avons ensuite procédé à une étude de la série d'oligomères glycoconjugués par spectroscopie infrarouge en solution, que nous avons menée sur les composés présentant les unités saccharidiques acétylées. L'étude a pu être menée dans le chloroforme sans problème de solubilité. En effet, on l'a vu, l'introduction des motifs glycaniques a très fortement amélioré la solubilité des oligomères dans les solvants organiques usuels. Les échantillons, à partir du dimère, ont donc été préparés par solubilisation dans le chloroforme à des concentrations de 2 mM. Les spectres des différents oligomères sont présentés Figure 86 afin de mettre en évidence une éventuelle évolution.

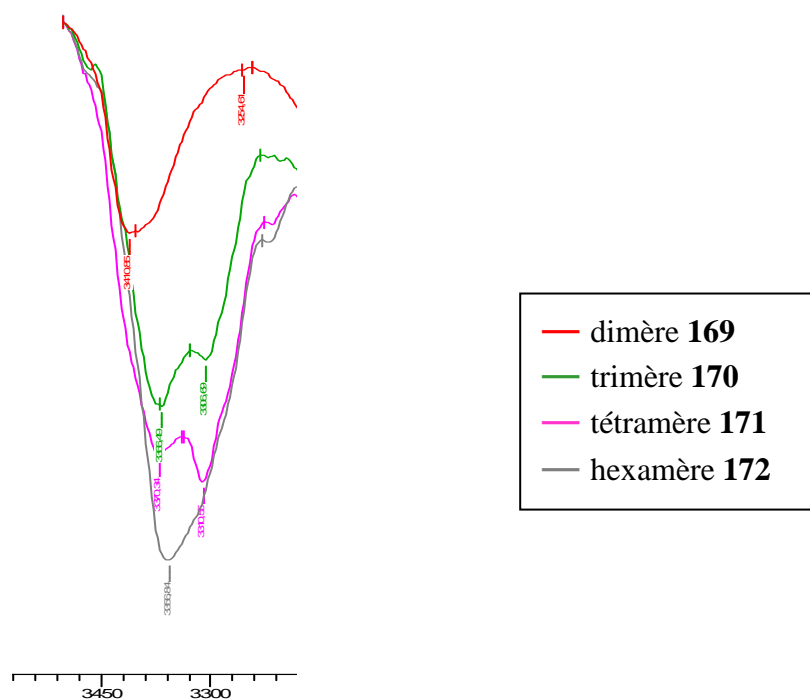


Figure 86 – Spectre IR (zone de vibration des liaisons NH) de la série « azoture » glycoconjuguée

L'évolution des spectres des glycoconjugués avec l'allongement de la chaîne peptidique est différente de celle observée précédemment pour les oligomères seuls. Le dimère présente une unique bande de vibration NH à 3405 cm^{-1} . Mais, dès le trimère **170**, tous les NH apparaissent déjà comme impliqués dans des liaisons hydrogène. En effet, on observe la présence, non pas d'un simple épaulement, mais quasiment de deux bandes distinctes, toutes les deux inférieures à la valeur charnière de 3400 cm^{-1} . Les fréquences de ces bandes indiquent, pour la première (3370 cm^{-1}), la présence de liaisons hydrogène faibles et, pour la seconde (3318 cm^{-1}), de liaisons hydrogène plus fortes. Cette tendance se retrouve sur le spectre du tétramère. L'intensité de la seconde bande de plus faible fréquence (3310 cm^{-1}) devient plus importante. En revanche, pour l'hexamère **172**, on n'observe plus qu'une seule bande plus large à 3357 cm^{-1} .

Au final, même si l'évolution en fonction de la longueur de chaîne est conforme, dans son ensemble, à ce qu'on observe généralement dans le cas d'oligomères dont la chaîne peptidique est structurée par liaisons hydrogène, les groupements acétates des unités saccharidiques, également accepteurs, peuvent perturber l'interprétation.

c- Dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur les composés glycoconjugués **173**, **174**, **175**, **176** et **177** présentant les unités saccharidiques désacétylées. En effet, les groupements acétate sont des chromophores dans l'UV lointain : leur présence pourrait donc fausser les résultats obtenus.

Les spectres ont été enregistrés dans l'eau, du fait de la trop faible solubilité des composés à partir du trimère dans le TFE et le méthanol.

Comme observé précédemment pour les oligomères précurseurs non glycosylés dans le TFE, les glycoconjugués jusqu'au tétramère semblent adopter une préférence conformationnelle similaire, caractérisée par un maximum positif à 222 nm et un maximum négatif à 195 nm (Figure 87). Ceci est confirmé par la présence d'un point isobestique entre les courbes de ces trois composés. L'hexamère, en revanche, semble adopter une conformation légèrement différente des composés plus courts.

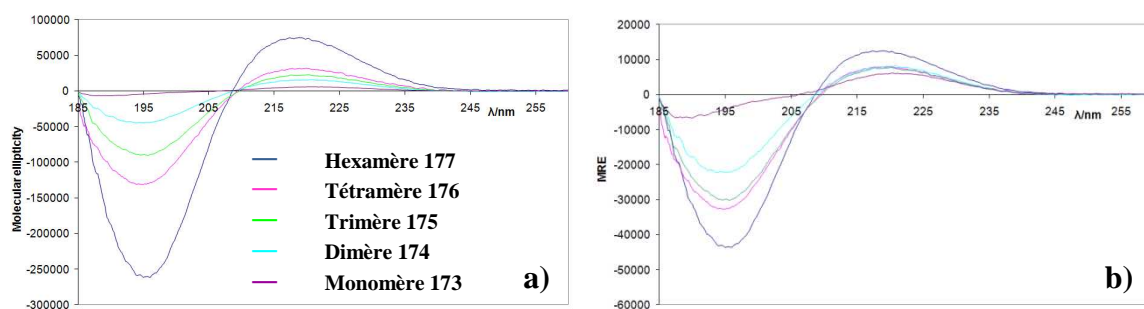


Figure 87 – Spectres de DC dans l'eau des composés glycoconjugués 173, 174, 175, 176 et 177 - a) Ellipticité moléculaire – b) MRE (à 20°C)

A partir de la Figure 87b), il est possible d'établir que les préférences conformationnelles changent avec la longueur de la chaîne peptidique.

- la préférence conformationnelle adoptée par le dimère semble différente de celles adoptées par le trimère et le tétramère
- le trimère et le tétramère ont des spectres comparables donc des préférences conformationnelles également comparables.
- l'hexamère, en revanche, adopte une préférence conformationnelle différente de celle du monomère et du dimère mais en relation avec celle du trimère et du tétramère, comme le montre la présence d'un second point isodichroïque (208 nm). L'augmentation de la MRE montre une éventuelle augmentation dans la régularité de la conformation adoptée par l'hexamère.

Bien que les spectres n'aient pas été enregistrés dans les mêmes solvants, une comparaison visuelle est tout de même possible entre les oligomères « -N₃ » précurseurs et les composés glycoconjugués correspondants.

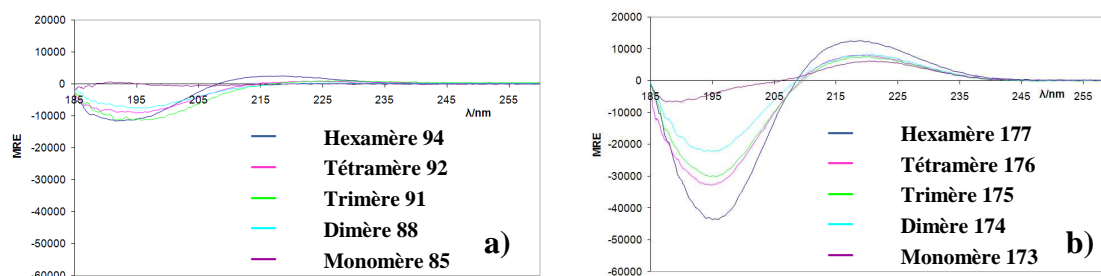


Figure 88 – MRE a) des oligomères « N₃ » dans le TFE et b) des composés glycoconjugués dans l'eau

Il apparaît que la présence des unités saccharidiques sur les oligomères et/ou la présence d'eau augmente significativement la régularité structurale adoptée par le squelette peptidique. On constate que les MRE des composés glycoconjugués (Figure 88 b)) sont beaucoup plus importantes que celles observées pour les oligomères « N₃ » précurseurs. De manière très intéressante, on constate, par ailleurs, que les allures des courbes de l'hexamère « N₃ » **94** et de son analogue glycosylé **177**, sans tenir compte de la glycosylation et de la nature du solvant (eau), suggèrent que ces deux composés adoptent la même préférence conformationnelle, au contraire des composés plus courts.

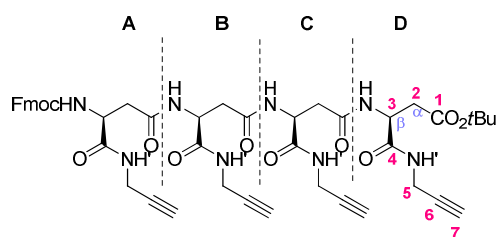
III- Analyse conformationnelle - Série « propargylamide »

a- RMN

Le choix de la pyridine-d₅ comme solvant deutéré s'est rapidement imposé puisqu'elle permet de solubiliser tous les oligomères jusqu'au tétramère. Nous avons dû mettre de côté l'étude de l'hexamère du fait de sa totale insolubilité dans la pyridine-d₅ et de sa trop faible solubilité dans le DMSO-d₆.

❖ Numérotation

La numérotation des protons est résumée sur la figure suivante.



Résidus : notés A, B, C... en partant de l'extrémité N-terminale

Carbones et protons:

- notés C_α et C_β dans le cadre de l'analyse conformationnelle
- notés 1,2,3... pour la description RMN (partie expérimentale)

Proton d'amide:

- chaîne principale : noté NH
- chaîne latérale: noté NH'

Ex : le proton porté par le carbone C_β du résidu A sera noté C_βH_A pour l'analyse conformationnelle et H_{3A} lors de l'attribution des signaux dans la partie expérimentale

Figure 89 –Numérotation pour la série « propargylamide »

Dans le cas particulier de cette série, l'étude conformationnelle a été réalisée dès le stade du dimère. En effet, la présence de fonctions amides sur les chaînes latérales (notés

NH') peut avoir une influence sur les propriétés de structuration en multipliant le nombre de liaisons hydrogène qui peuvent s'établir.

i- RMN 1D

Les spectres ^1H du dimère, du trimère et du tétramère **70**, **73** et **74** dans la pyridine- d_5 sont représentés sur la Figure 90.

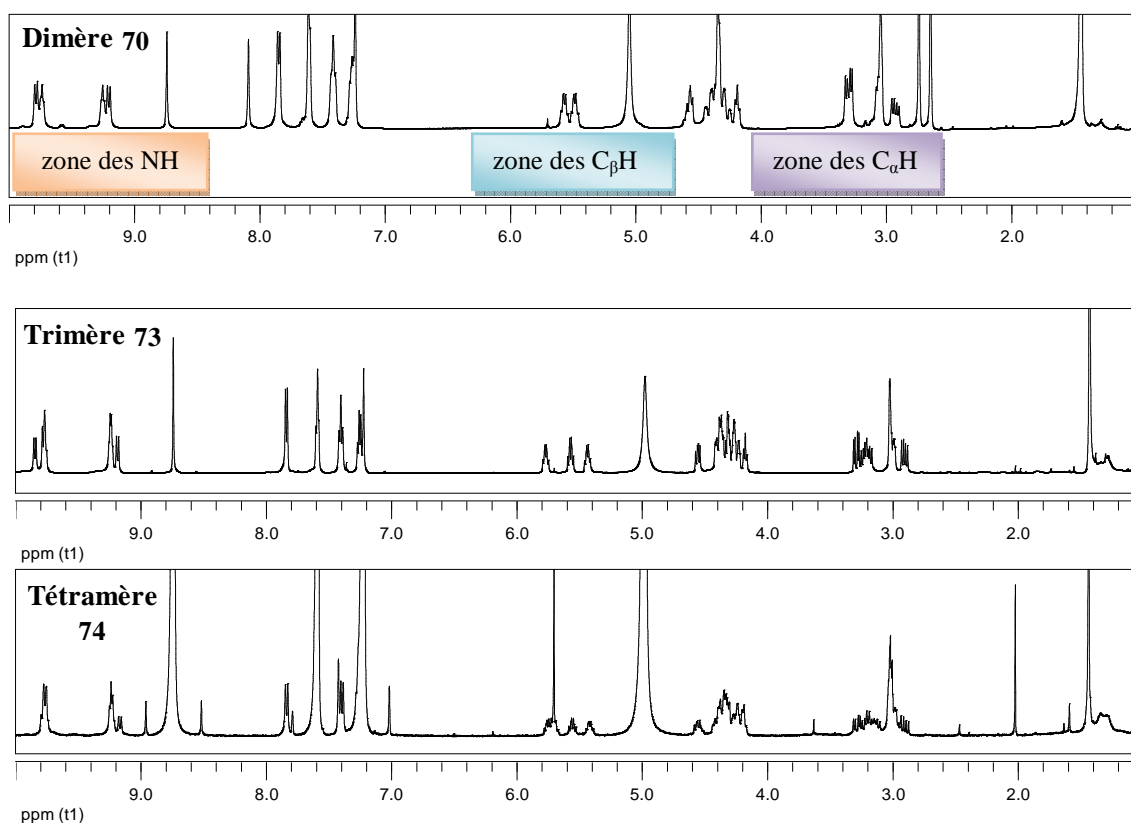


Figure 90 – Spectres ^1H du dimère 70 (400 MHz), du trimère 73 (500 MHz) et du tétramère 74 (500 MHz) dans la pyridine- d_5

Les déplacements chimiques des protons NH, NH' ainsi que les valeurs des constantes de couplage 3J (NH, C β H) sont reportées dans le tableau suivant pour le dimère et le trimère uniquement, l'attribution du tétramère n'ayant pas pu être effectuée du fait du recouvrement des signaux dans la zone des NH.

Oligomère	Résidu A		Résidu B		Résidu C	
	NH	NH'	NH	NH'	NH	NH'
Dimère 70	9,21 (8,6 Hz)	9,25	9,74 (8,5 Hz)	9,78	-	-
Trimère 73	9,18 (8,6 Hz)	9,24	9,84 (8,6 Hz)	9,24	9,78 (8,6 Hz)	9,77

Tableau 15 – Valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage dans la pyridine-d₅

Contrairement à une étude par RMN dans des solvants plus « classiques », comme CDCl₃ ou CD₃OH, il est difficile de tirer quelque conclusion sur la seule base de la valeur des déplacements chimiques lors d'une étude dans la pyridine-d₅. En effet, dans la littérature, il existe peu d'exemples d'études conformationnelles menées dans la pyridine-d₅. On retrouve essentiellement des exemples dans les premiers travaux sur les β-peptides du groupe de Seebach.²¹² Dans notre cas, on peut constater que les déplacements chimiques des protons d'amide NH et NH' sont relativement élevés, mais il est difficile à ce stade de savoir si cela est dû à une implication des protons concernés dans une liaison hydrogène ou à une exposition au solvant, sachant que la pyridine peut potentiellement participer à des liaisons hydrogène. Les constantes de couplage, quant à elles, ne sont pas suffisamment élevées pour être indicatives d'une préférence conformationnelle locale. Mais de manière générale, l'ensemble du spectre présente une bonne dispersion, notamment dans les zones C_αH et C_βH. Il est toutefois intéressant de constater, pour tous les oligomères, la présence de deux types d'amide latéraux différents (Figure 91).

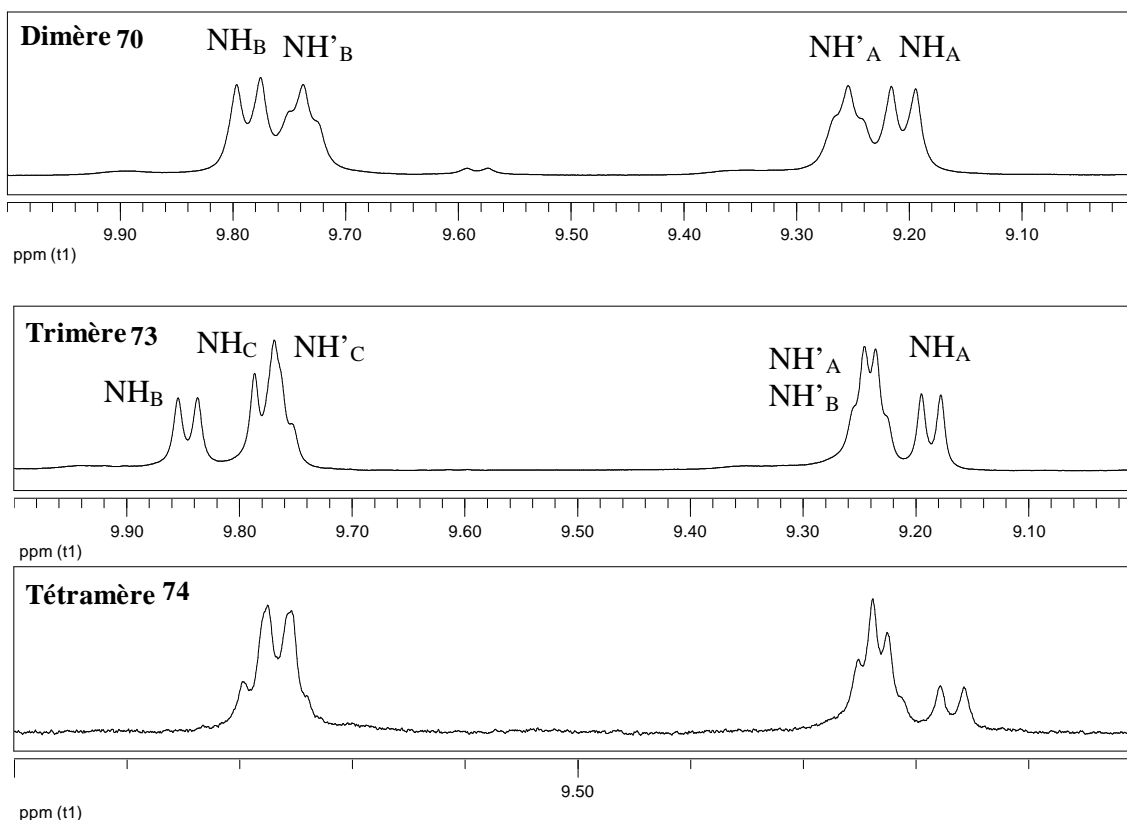


Figure 91 – Zone des NH du dimère 70, du trimère 73 et du tétramère 74 (500 MHz) dans la pyridine-d₅

Dans le cas du dimère, on trouve un premier bloc de protons comportant NH_A (carbamate) et NH'_A et un deuxième bloc comportant NH_B (amide) et NH'_B. On peut donc dire que les environnements des protons NH'_A et NH'_B doivent être différents. Ces deux protons sont distants de 0,5 ppm, ce qui n'est tout de même pas négligeable. En ce qui concerne le trimère, le proton NH'_C est distant de 0,5 ppm des deux autres protons d'amide latéraux, NH'_B et NH'_A. Ainsi, dans les deux cas, le proton NH' de l'extrémité C-terminale semble avoir un environnement bien différent des deux autres protons NH'.

❖ Titration au DMSO sur le trimère 73

Nous avons, par ailleurs, étudié la présence de liaisons hydrogène éventuelles sur le trimère **73** par titration au DMSO-d₆. Les spectres ¹H de plusieurs échantillons, de concentrations différentes en DMSO, ont été enregistrés dans la pyridine-d₅. La Figure 92 présente la variation de déplacement chimique des protons NH en fonction de la quantité de DMSO-d₆.

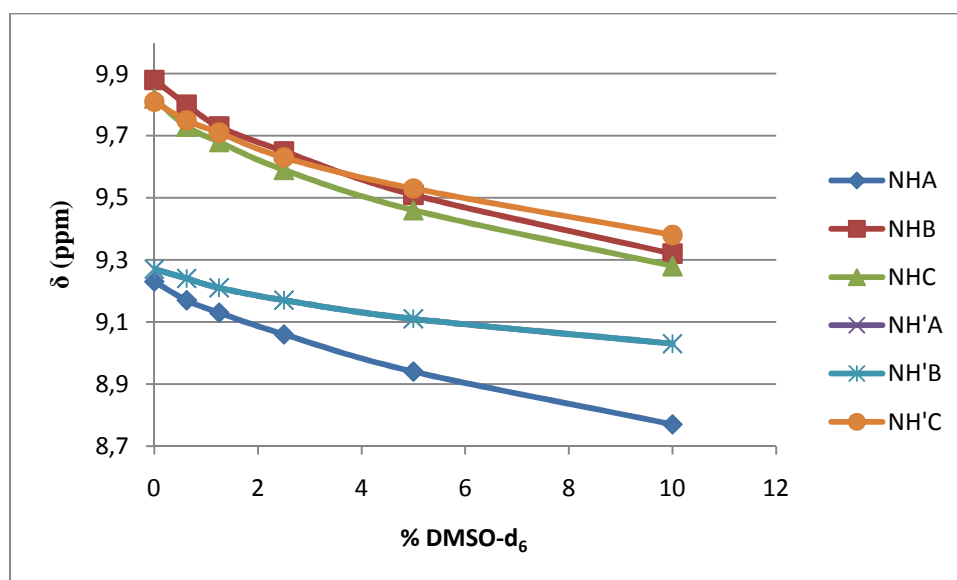


Figure 92 – Variation du déplacement chimique des protons NH du trimère 73 dans la pyridine-d₅ en fonction de la quantité de DMSO-d₆

Globalement, l'ensemble des protons NH voient leur déplacement chimique diminuer. Le fait intéressant réside dans l'amplitude de cette variation. En effet, on constate que les protons d'amide latéraux NH'_A et NH'_B sont ceux pour lesquels cette variation est la plus limitée (- 0,24 ppm entre 0 et 10% de DMSO), les autres protons subissent une diminution de leur déplacement chimique plus importante (de 0,43 à 0,56 ppm entre 0 et 10% de DMSO). Ceci suggère donc que l'exposition au solvant des protons NH'_A et NH'_B est moindre, donc qu'ils seraient susceptibles d'être engagés dans des liaisons hydrogène.

Cette expérience de titration permet de mettre en évidence que tous les protons NH ne sont pas exposés de la même manière au solvant. Ceux dont le déplacement chimique varie le plus sont ceux qui sont les plus accessibles au solvant, c'est-à-dire ceux qui ne sont pas associés de façon intramoléculaire par liaisons hydrogène. Dans le cas de ces protons, le DMSO introduit entre en compétition avec la pyridine pour créer des liaisons hydrogène soluté-solvant. Dans le cas des NH d'amide associés intramoléculairement, la moindre accessibilité de ces protons au solvant se traduit par une moins grande sensibilité à l'addition de DMSO et, en fonction de l'amplitude de variation du δ_{NH} , il est possible de distinguer les protons en termes de force d'association.

Par ailleurs, dans notre cas, les spectres sont enregistrés dans la pyridine-d₅, ce qui ne nous permet pas d'effectuer le même raisonnement que dans CDCl₃. En effet, de façon générale, dans CDCl₃, les protons impliqués dans des liaisons hydrogène sont souvent les plus déblindés. Ce n'est manifestement pas notre cas : les protons NH (NH'_A et NH'_B) les plus blindés sont ceux qui semblent être associés. Il faut tenir compte du fait que la pyridine est un

solvant accepteur de protons, ce qui a tendance à fortement déblindier les protons non impliqués dans des liaisons hydrogène de façon intramoléculaire. Il n'est donc pas évident de se baser sur les valeurs de déplacements chimiques dans la pyridine-d₅ pour récolter des informations en termes d'association par liaisons hydrogène, comme on pourrait le faire dans CDCl₃ par exemple.

ii- Etude des corrélations dipolaires (effets nOe)

Le spectre de NOESY du trimère **73** a été enregistré avec plusieurs temps de mélange : 300ms, 400ms et 1000ms. On peut observer les mêmes tâches de corrélation quel que soit le temps de mélange. Il est donc certain que les corrélations observées ne sont pas issues d'un effet de diffusion de spin mais sont bien le reflet de nOe. La meilleure carte de NOESY, obtenue avec un temps de mélange de 1000ms, est représentée sur la Figure 93.

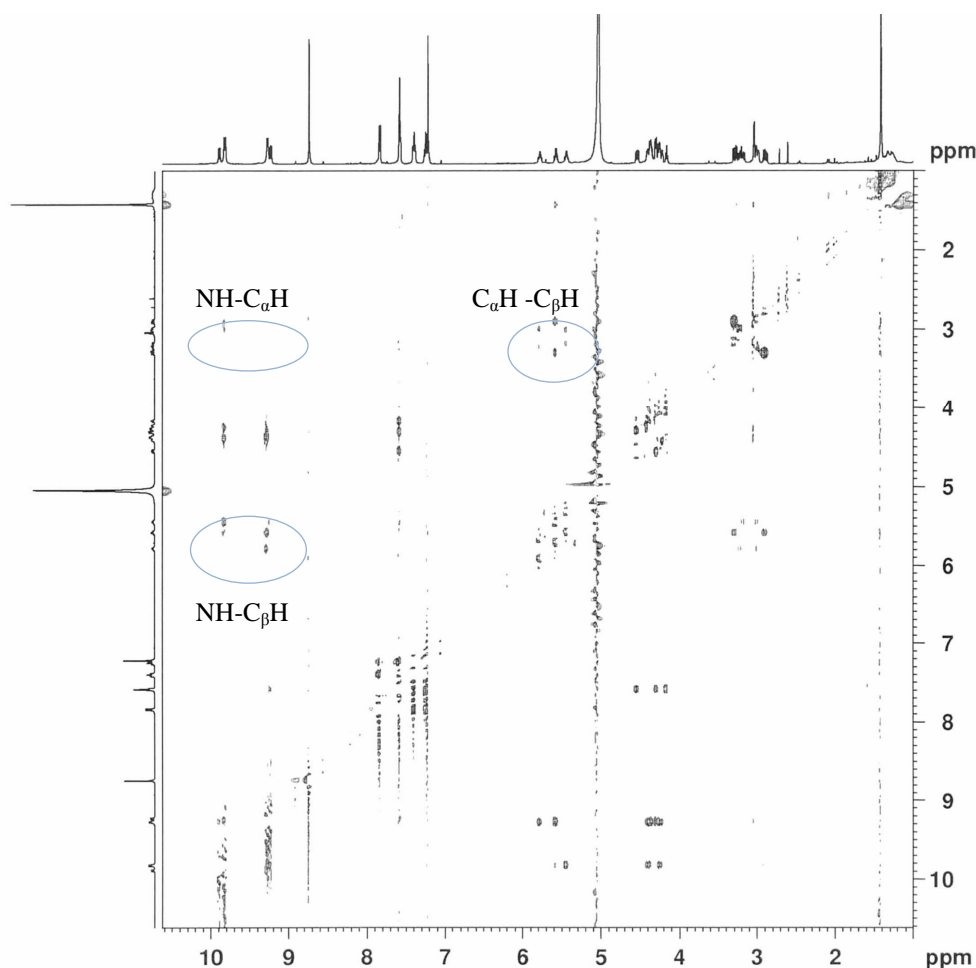


Figure 93 – Carte de NOESY (500 MHz) du trimère **73**

Comme précédemment, nous allons plus particulièrement nous intéresser à trois zones de corrélation dipolaire : celle des corrélations NH-C α H, celle des corrélations NH-C β H, et enfin celle des C α H -C β H.

❖ *Zone des NH-C α H*

La zone considérée est représentée sur la Figure 94.

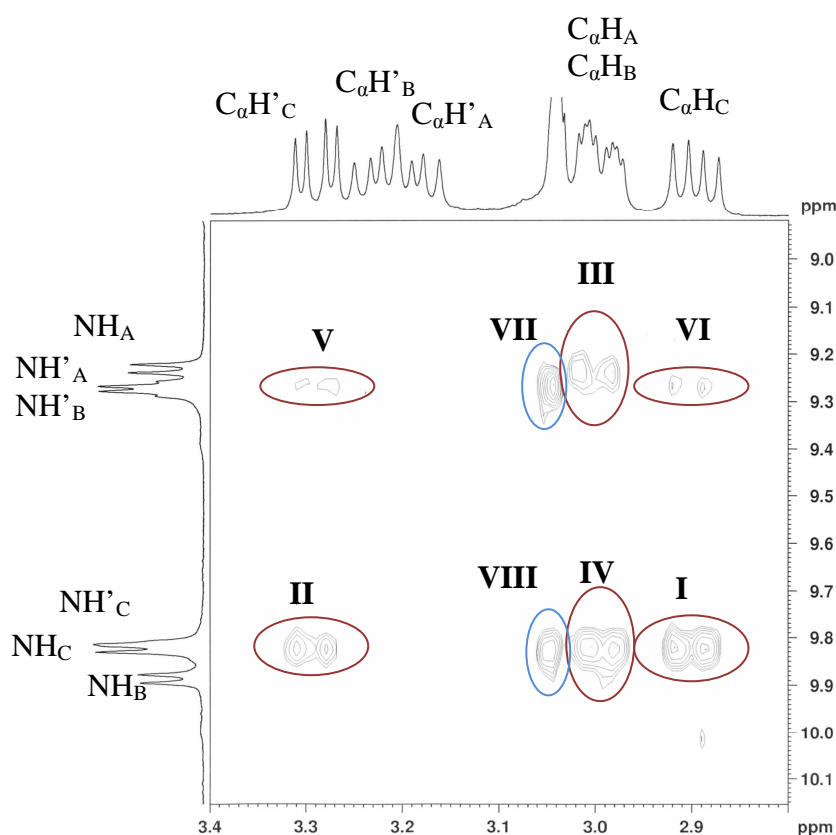


Figure 94 – Zone des corrélations NH-C α H

Les corrélations dipolaires de type NH-C α H observées sont essentiellement du type NH $_i$ -C α H $_i$ au sein d'un même résidu et correspondent aux tâches **I**, **II**. La nature de la corrélation nOe représentée par la tâche **III** n'a pas pu être définie : il peut s'agir d'un nOe de type NH $_i$ -C α H $_i$ (NH $_A$ \leftrightarrow C α H $_A$) ou NH $_i$ -C α H $_{i+1}$ (NH $_A$ \leftrightarrow C α H $_B$). La tâche **IV** représente une corrélation nOe impliquant soit le proton NH $_C$, soit le proton NH' $_C$. Dans les deux cas, il peut s'agir d'une interaction de type $i \leftrightarrow i-1$ (NH $_C$ /NH' $_C$ \leftrightarrow C α H $_B$) ou $i \leftrightarrow i-2$ (NH $_C$ /NH' $_C$ \leftrightarrow C α H $_A$). On observe également deux tâches, **V** et **VI**, de faible intensité, qui correspondent à un nOe de type NH' $_i$ -C α H $_{i+1}$ (NH' $_B$ \leftrightarrow C α H $_C$) ou NH $_i$ -C α H $_{i+2}$ (NH' $_A$ \leftrightarrow C α H $_C$), impliquant les protons NH' $_A$ ou NH' $_B$ que nous n'avons pas réussi à différencier. Les tâches **VII** et **VIII**

correspondent à des nOe entre les protons d'amide latéraux NH'_i et les protons acétyléniques du motif propargylamide.

❖ *Zone des NH-C $_{\beta}$ H*

La zone de corrélation dipolaire $NH_i-C_{\beta}H_i$ est représentée Figure 95.

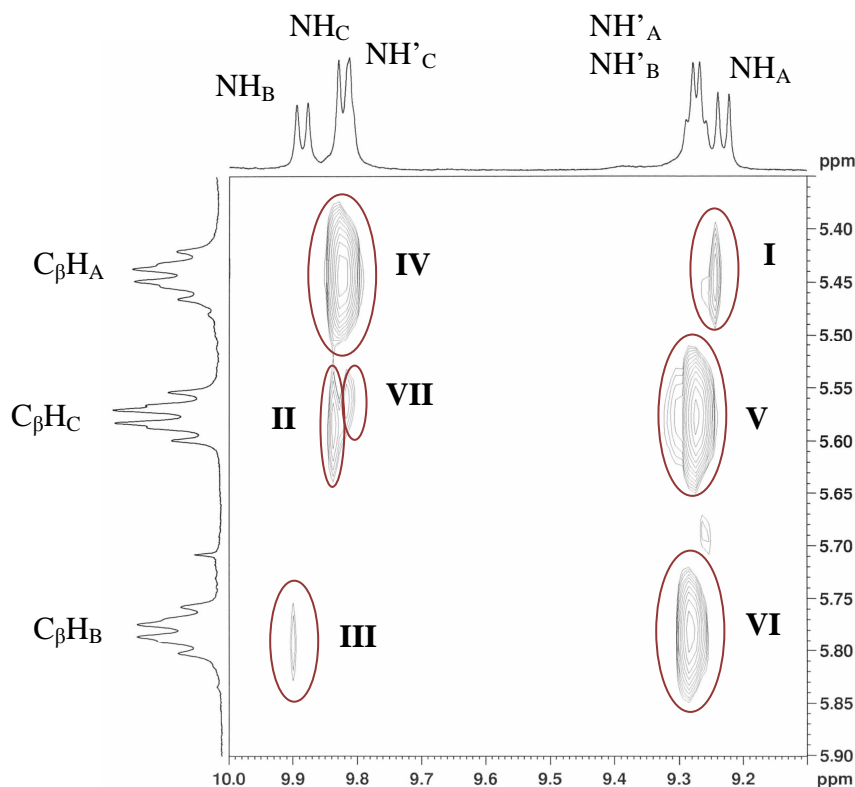


Figure 95 – Zone des corrélations NH-C $_{\beta}$ H

Sur cette carte, on observe des corrélations de type $NH_i-C_{\beta}H_i$ intra-résidu, représentées par les tâches **I**, **II** et **III**. On observe un nOe, représenté par la tâche **IV**, qui peut être de type $NH'_i-C_{\beta}H_{i-2}$ ($NH'_C \leftrightarrow C_{\beta}H_A$) ou $NH_i-C_{\beta}H_{i-2}$ ($NH_C \leftrightarrow C_{\beta}H_A$). Cette corrélation dipolaire est intéressante puisqu'elle met en évidence la possible proximité spatiale des résidus A et C, accompagnant un possible début de repliement de la chaîne peptidique. La tâche de corrélation **VII** représente un nOe d'intensité moyenne intra-résidu $NH'_C \leftrightarrow C_{\beta}H_C$. Il est impossible de déterminer avec certitude la nature exacte des nOe représentés par les tâches de corrélation **V** et **VI**, du fait du recouvrement des signaux des deux protons NH'_A et NH'_B . La seule information qu'on puisse donner ici est qu'il s'agit d'effets issus d'une proximité spatiale à courte ou moyenne distance. La tâche **V** représente les deux corrélations $NH'_i-C_{\beta}H_{i+2}$ ($NH'_A \leftrightarrow C_{\beta}H_C$) ou $NH'_i-C_{\beta}H_{i+1}$ ($NH'_B \leftrightarrow C_{\beta}H_C$) superposées.

❖ Zone des $C_{\alpha}H-C_{\beta}H$

La zone de corrélation $C_{\alpha}H-C_{\beta}H$ n'est pas informative puisqu'on n'observe uniquement des corrélations intra-résidu.

Conclusion de l'étude par NOESY

De nombreuses tâches de corrélations ne peuvent être attribuées avec certitude du fait des superpositions des signaux. Néanmoins, le nombre de corrélations inter-résidus est assez important, ce qui peut signifier l'existence d'une préférence conformationnelle marquée pour ce trimère. En particulier, des corrélations entre les unités A et C sont le signe d'un probable repliement de la chaîne peptidique. Une sélection de corrélations nOe, pouvant confirmer cela, est représentée Figure 96. Les corrélations en pointillés sont celles pour lesquelles un doute subsiste, à savoir, d'une part, nOe **1** ou nOe **2**, et d'autre part, nOe **3** ou nOe **4**.

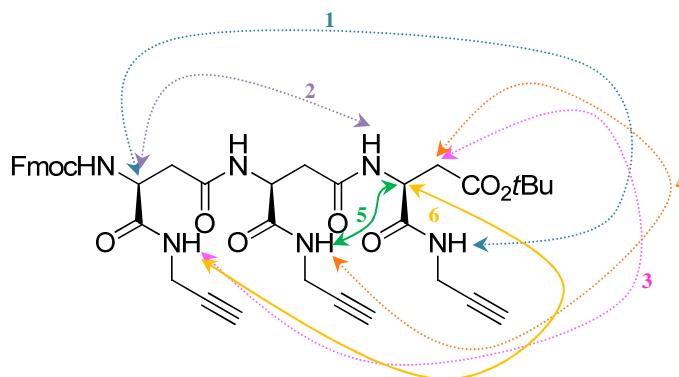


Figure 96 – Sélection de nOe pouvant indiquer un repliement du trimère 73 dans la pyridine-d₅

Conclusion générale

La corrélation des différentes informations collectées lors de l'étude par RMN, à savoir la titration au DMSO-d₆ et l'étude des nOe, nous laisse penser que le trimère **73** présente un début de repliement assez significatif. De façon surprenante, ceci fait intervenir les chaînes latérales et non pas la chaîne peptidique principale. La titration nous a permis de montrer en effet que les protons d'amide latéraux NH'_A et NH'_B devaient certainement être impliqués dans des liaisons hydrogène. De plus, les tâches de corrélations nOe montrent une proximité spatiale des résidus A et C.

Ces observations devront être complétées par une étude par modélisation moléculaire afin de déterminer avec le plus de certitude possible le type de conformation adoptée par le trimère **73** et la nature d'un éventuel pseudo-cycle.

F- Résultats & Discussion : Projet GELS

I- Introduction

1- Origine du projet

Durant nos travaux concernant la synthèse des plateformes β -peptidiques, nous avons observé que certains composés de la série « propargylamide » montraient une forte tendance à former des gels dans certains solvants organiques. Ce comportement a été à l'origine de nombreux problèmes, notamment en termes de purification des composés concernés.

Dès lors, il nous a semblé intéressant d'étudier de manière plus approfondie ces propriétés de gélification afin d'en comprendre les mécanismes et tirer profit des difficultés que nous rencontrions.

2- Etude bibliographique

Le design de nouveaux biomatériaux capables d'interagir avec les tissus biologiques selon des processus bien définis suscite un intérêt grandissant et fait appel à des compétences issues de différents domaines : chimie organique, chimie des matériaux, biochimie... Les biomatériaux sont communément définis comme des matériaux biocompatibles avec l'organisme humain. Ils trouvent notamment des applications médicales et para-médicales (prothèse, cartilage, tissu, implant) et peuvent être de natures très différentes : polymères, céramiques, métaux...

Dans ce contexte, les gels représentent une des classes de biomatériaux les plus importantes. Un gel est défini comme un matériau solide à l'aspect de gelée. C'est un système dilué constitué d'un réseau élastique qui ne présente pas de flux liquide quand il se trouve dans un état rigidifié.²¹³ Il existe deux types de gels : les organogels et les hydrogels. Un organogel peut être défini comme un matériau solide non cristallin, thermoplastique composé d'une phase liquide organique piégée dans un réseau tridimensionnel enchevêtré. Cette définition s'applique également à un hydrogel à la différence près que, dans ce cas, la phase liquide emprisonnée dans le réseau tridimensionnel est non plus un solvant organique mais de l'eau. Les hydrogels présentent des espaces interstitiels pouvant contenir entre 90% et 99% d'eau en masse.²¹⁴ Les gels peuvent notamment être préparés par polymérisation chimique ou par auto-assemblage physique mettant en jeu des interactions non covalentes telles que les liaisons hydrogène, les interactions π - π , les interactions électrostatiques et de Van Der Waals.

Le processus d'auto-assemblage hiérarchique est omniprésent dans les systèmes biologiques. On peut citer l'exemple bien connu du collagène, une des protéines les plus abondantes chez les mammifères dans laquelle trois chaînes polypeptidiques qui se replient en une triple hélice peuvent s'auto-assembler pour former les fibres de collagène.

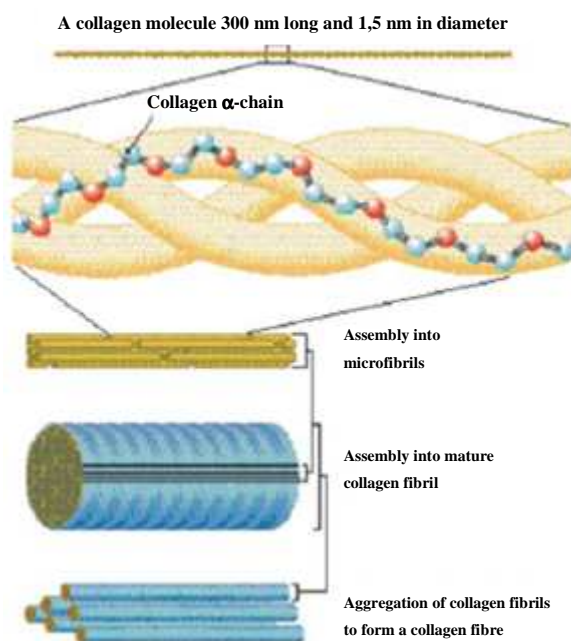


Figure 97 – Processus d'autoassemblage aboutissant à la formation des fibres de collagène²¹⁵

Le processus de formation d'un gel peut être déclenché de différentes façons : variation de la température, du pH, voie enzymatique.

Le champ des molécules capables de s'auto-assembler et de former des gels est très vaste. Depuis peu, les composés de bas poids moléculaire sont de plus en plus étudiés. La découverte et le développement de ce type de composé pourraient conduire à de applications potentielles dans le domaine des matériaux pour les nano- et les biotechnologies. Nous restreindrons notre étude bibliographique aux composés de type peptidique puisque cela nous concerne plus particulièrement.

❖ *Organogels*

Les organogels sont issus d'une classe de molécules capables de s'auto-assembler à différents niveaux pour former des superstructures organisées.²¹⁵ Beaucoup de matériaux de type gel sont constitués de fibres assemblées en un réseau tridimensionnel immobilisant une

grande quantité de solvant.²¹⁶ De nombreuses études ont été menées sur des organogels, notamment sur l'influence de la nature du solvant sur le processus de gélification macroscopique. Ainsi, Makarevic *et al.*²¹⁷ et Hirst *et al.*²¹⁸ ont montré qu'il existait une corrélation entre la température de gélification et la constante diélectrique des solvants.

Récemment, le groupe de Li a étudié la formation d'un organogel au départ d'un dipeptide de type diphenylalanine totalement déprotégé aux extrémités C- et N-terminales.²¹⁹ Les auteurs ont montré que la formation du gel mettait en jeu des interactions de type « π - π stacking » intermoléculaires.

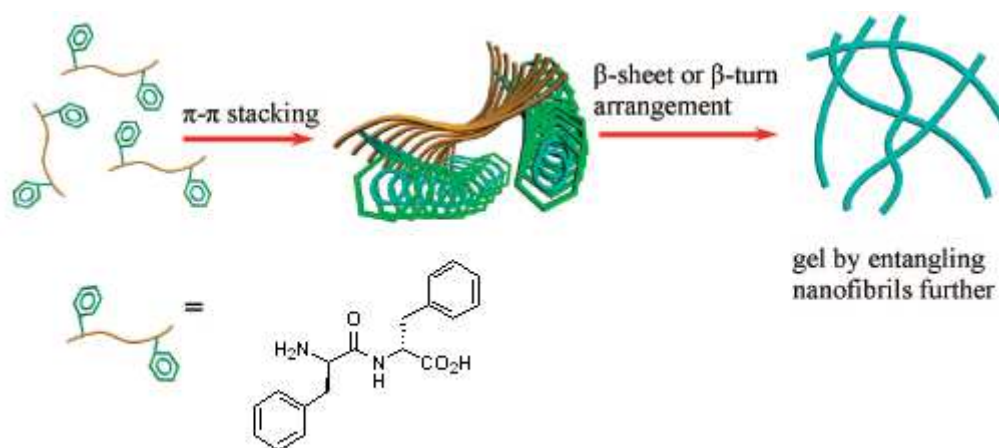


Figure 98 – Assemblage tridimensionnel de diphenylalanine dans le chloroforme

La diphenylalanine est solubilisée dans une petite quantité de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. L'addition de chloroforme sur cette solution déclenche le processus de gélification. Le caractère thermoréversible de l'organogel obtenu a été mis en évidence comme le montre la Figure 99.

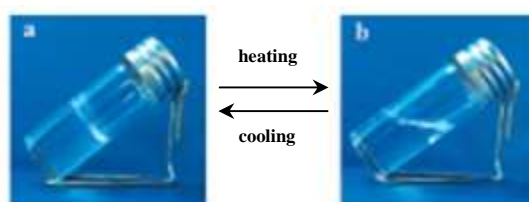


Figure 99 – Réversibilité du processus de gélification

Les auteurs ont tenté avec succès d'incorporer des nanoparticules d'or ainsi que des Quantum Dots, cristaux semiconducteurs de dimensions nanométriques présentant des propriétés de fluorescence ajustables par le contrôle de leur diamètre. De tels organogels peuvent trouver des applications dans le domaine de l'optique et de l'électronique.

On peut également citer les travaux de Taubert et coll. qui ont montré qu'il était possible de contrôler la réaction de minéralisation de l'argent dans une matrice de type organogel au départ de deux oligovalines. Ceci a permis la synthèse de nanoparticules d'argent.

❖ *Hydrogels*

L'étude des hydrogels au départ de molécules de bas poids moléculaire prend tout son sens si on considère le formidable potentiel qu'ils représentent en termes d'applications notamment biologiques et médicales. Ils peuvent en effet être utilisés pour la fabrication de tissus cellulaires utilisés en médecine régénérative²²⁰ ou comme vecteur pour la libération ciblée de principes actifs dans l'organisme.^{221,222} Les hydrogels peuvent également être utilisés pour la capture et l'élimination de polluants.²²³

Dans le domaine des peptides, on peut citer les travaux d'Ulijn et coll. qui ont travaillé sur des dipeptides.²²⁴ Leurs travaux sur les hydrogels au départ de diphenylalanine ont précédé ceux de Li et coll. sur les organogels. Dans le cas du groupe d'Ulijn, la structure du dipeptide est légèrement différente puisque l'extrémité *N*-terminale est protégée par un groupement Fmoc. Le dipeptide est mis en solution dans de l'eau et le processus de gélification est ici déclenché par variation du pH du milieu.

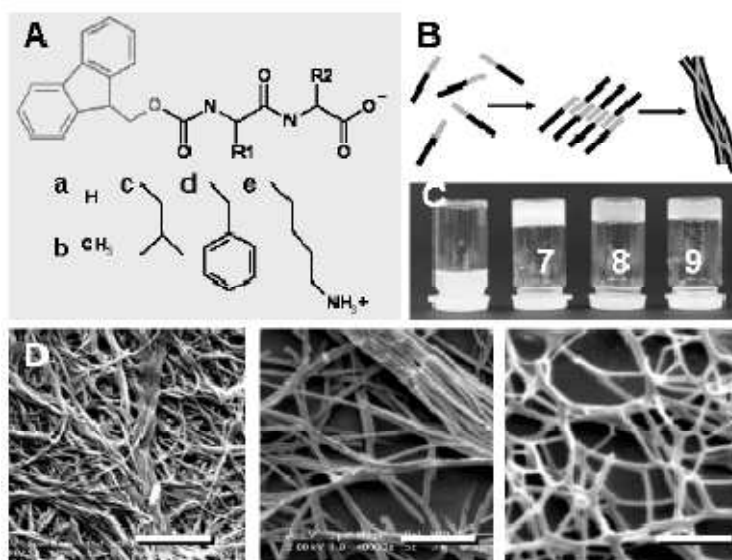


Figure 100 – Hydrogels sur des dipeptides sous forme d'acide carboxylique

L'auto-assemblage des peptides met en jeu des liaisons hydrogène intermoléculaires et, dans le cas particulier des Fmoc-peptides, les interactions π - π s'ajoutent, favorisant ainsi le processus de gélification.

Selon la nature des groupements R_1 et R_2 , les auteurs ont observé la présence ou l'absence de gélification. Certains de ces gels, stables à pH physiologiques, ont été testés pour des cultures cellulaires et les premiers résultats obtenus ont été très encourageants.

On peut citer les travaux de Xu et coll. qui ont étudié la formation d'hydrogels au départ de dipeptides comportant un résidu β -aminoacide.²²⁵ Parmi les quatre composés synthétisés, deux d'entre eux, Gly- β^3 -Ala et β^3 -HPhe- β^3 -HPhe couplés à un dérivé de naphthalène, forment des hydrogels.

Les mêmes auteurs ont également étudié avec succès la formation d'hydrogels par déclenchement enzymatique au départ de peptides contenant des β -aminoacides.²²⁶

3- Objectifs

L'étude bibliographique dont nous avons donné un bref aperçu nous a permis de constater que la grande majorité des études de gélification concernant des peptides portaient sur des α -peptides. Il existe à notre connaissance très peu d'exemples dans la littérature de gels, hydro- ou organogels, formés à partir de β -peptides.^{225,226}

L'utilisation de peptidomimétiques tels que les β -peptides élargit de façon significative le champ d'étude du fait de la possibilité de présenter des chaînes latérales non protéinogéniques. Dans notre cas, la mise à profit de certaines structures glycoconjuguées constitue une originalité. A notre connaissance, il existe très peu d'exemples de molécules glycoconjuguées qui auraient été utilisées dans des études de gélification.

Nous avons donc décidé d'étudier les propriétés de gélification des oligomères les plus courts de la série « propargylamide » puisque la formation de gel n'a été observée que dans cette famille.

Ce projet fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Professeur Rein Ulijn (Department of Pure & Applied Chemistry, University of Strathclyde, Royaume-Uni) et avec l'équipe du Docteur Alison Edwards (Chemistry and Drug Delivery, Medway School of Pharmacy, Royaume-Uni). Les composés synthétisés formant des gels ont été analysés d'un point de vue structural par l'équipe du Professeur Ulijn (Microscopie, Diffraction, Infrarouge, Fluorescence...).

II- Etudes des propriétés de gélification

1- Etude des composés non glycoconjugués

a- Organogel

Le comportement de gélification a été observé de façon significative sur le dimère **70** de la série « propargylamide » protégé par le couple de groupements protecteurs Fmoc/OtBu. La gélification se produisait lorsque le composé, solubilisé dans du DMF, était mélangé à d'autres solvants organiques.

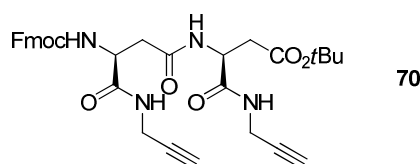


Figure 101 – Dimère 70 formant un organogel

Nous avons donc entamé une étude plus approfondie afin de déterminer les conditions optimales de formation de ce gel. Il s'agissait de trouver le(s) solvant(s) adéquat(s) pour que la gélification ait lieu dans une gamme de concentration correcte. En effet, le processus de gélification doit être mené dans un milieu suffisamment dilué pour permettre le phénomène d'auto-assemblage intermoléculaire. Dans le cas contraire, pour un milieu concentré en espèce gélifiante, des phénomènes d'aggrégation peuvent s'ajouter au processus d'auto-assemblage, jusqu'à devenir prédominants. L'interprétation des observations serait alors faussée.

Nous avons donc testé différents solvants et différentes conditions.

- **Conditions expérimentales**

Les expériences ont été menées dans des piluliers de 1 cm de diamètre puis dans des tubes à hémolyse de 0,5 cm de diamètre (voir tableau 1 – Partie expérimentale).

Le dipeptide **70** (~ 5 mg) est solubilisé dans un minimum de DMF (20 µL) et un volume mesuré de co-solvant (dichlorométhane, toluène, cyclohexane) est ajouté à la solution, excepté pour l'essai 12 pour lequel le DMF a été ajouté dans un deuxième temps (Partie expérimentale).

On considère qu'un gel est obtenu lorsqu'on observe un changement de viscosité du milieu aboutissant à un matériau d'aspect solide. Le tube doit pouvoir être retourné à la

verticale sans « flux gravitationnel », c'est-à-dire qu'aucune phase liquide ne doit s'écouler.^{218,224}

- **Observations**

Il est apparu nécessaire d'utiliser une quantité minimale de DMF afin de solubiliser le dimère **70** avant d'ajouter le co-solvant déclencheur de la gélification. Li et coll. rapportaient lors de l'étude de la diphénylalanine que les seuls solvants ayant déclenché la gélification étaient le chloroforme et les solvants aromatiques.²¹⁹ Dans notre cas, les meilleures conditions sont remplies lorsqu'on utilise du toluène. On obtient un organogel translucide très stable dans le temps : 30 jours après, l'aspect du gel était toujours le même.



Figure 102 – Organogel formé selon les conditions 7 (voir tableau récapitulatif Partie expérimentale)

Dans notre cas, plusieurs causes peuvent être à l'origine de la gélification. En effet, le dipeptide **70** présente un groupement Fmoc qui participe au processus d'auto-assemblage par l'établissement d'interactions de type π - π , comme évoqué dans la littérature. De plus, la forte densité de groupes amides sur une molécule de cette taille (chaînes principales et latérales) doit jouer un rôle très important dans le processus d'assemblage tridimensionnel par l'établissement possible de multiples liaisons hydrogène. Il faut noter que le comportement de gélification avait déjà été observé sur le dimère **60** protégé sous forme de Boc et d'ester méthylique. Ceci suggère clairement que la contribution du groupement Fmoc ne fait que s'ajouter à celle des liaisons hydrogène.

- *Analyses structurales*

Le gel obtenu a été étudié par deux méthodes spectroscopiques. L'équipe du Dr Ulijn a tenté d'obtenir des clichés de microscopie en utilisant la technique de l'AFM (Atomic Force Microscopy), mais les images étaient de qualité moyenne.

- *Fluorescence et FT-IR*

Les spectres de fluorescence et FT-IR du gel sont représentés sur la Figure 103.

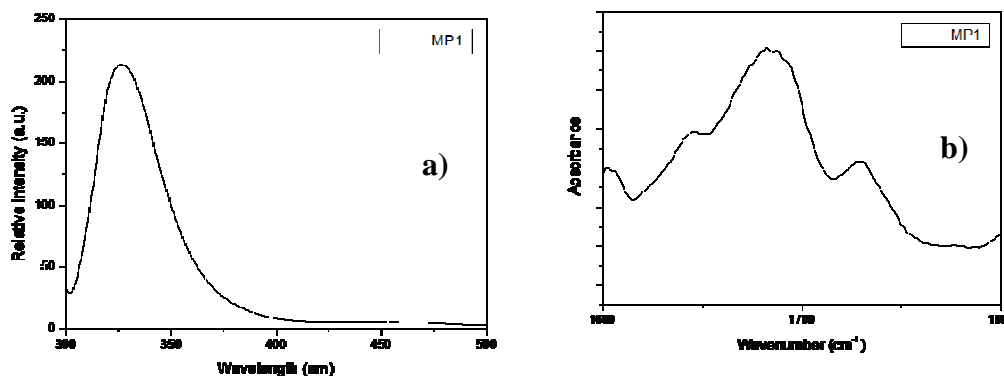


Figure 103 – Spectres de a) fluorescence et b) FT-IR de l'organogel de 70

On observe un pic d'émission de fluorescence maximum vers ~ 325 nm, ce qui correspond aux espèces de type excimère issues des groupes fluorényle. Un excimère (de l'anglais *excimer* pour *excited dimer*) est une ensemble constitué de deux monomères, identiques ou non, qui ne peut exister qu'à l'état excité. Le retour à l'état fondamental provoque la dissociation de l'excimère. Cette bande d'émission caractéristique montre bien l'établissement d'interactions entre les groupes fluorényles, à l'origine de la formation de l'organogel.

Sur le spectre IR, la zone des carbonyles ($1500-1750$ cm^{-1}) est plus particulièrement étudiée. Le profil du spectre dans cette zone (présence de deux bandes entre 1600 et 1650 cm^{-1}) permet de mettre en évidence l'établissement de liaisons hydrogène. Ainsi, ces interactions viennent s'ajouter aux interactions de type $\pi-\pi$ précédemment mises en évidence. L'allure du spectre FT-IR suggère, ici, un arrangement de type feuillet β antiparallèle (Figure 104). En effet, la présence d'une bande de faible intensité vers $1610 - 1640$ cm^{-1} et d'une bande moyenne aux alentours de $1680 - 1695$ cm^{-1} est caractéristique de ce type d'arrangement.

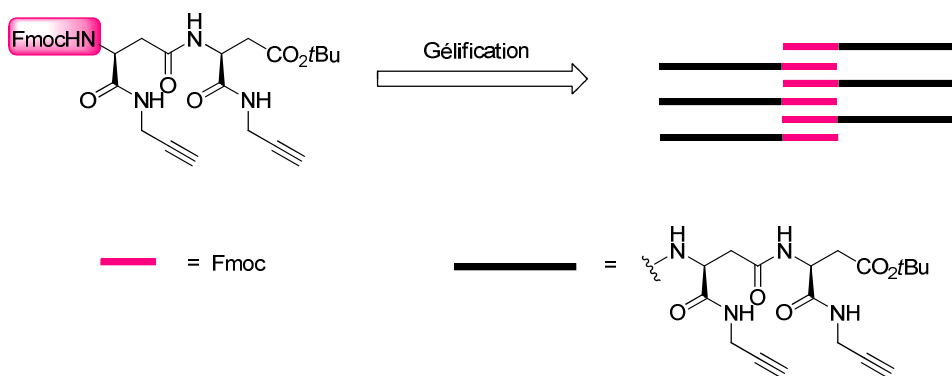


Figure 104 – Schématisation de l’assemblage tridimensionnel du dimère 70

b- Hydrogel

i- Déclenchement par variation du pH

Le dimère **70** ayant montré une tendance à former un gel dans des solvants organiques, il nous a semblé intéressant d’examiner le processus de gélfication dans un milieu aqueux. C’est pourquoi nous avons étudié le dimère **72** déprotégé au niveau de l’extrémité C-terminale.

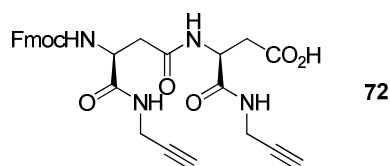


Figure 105 – Dimère 72 testé pour l’obtention d’hydrogel

Nous avons appliqué une méthodologie décrite dans la littérature consistant en un déclenchement de la gélfication par variation du pH.²²⁴

- **Conditions expérimentales**

Un volume mesuré d’eau ultra-pure est ajouté à une quantité connue d’acide **72** pour obtenir une suspension qui est soumise aux ultrasons pendant 30-60 secondes. Le pH de la solution est alors augmenté jusqu’à une valeur supérieure à 8 par ajout d’une solution de soude 0,5M goutte à goutte (50µL par 50µL). On obtient une solution limpide après agitation au vortex. La solution est ensuite lentement acidifiée par ajout d’acide chlorhydrique 0,1M goutte à goutte (25µL par 25µL) suivi d’une agitation au vortex. Le pH du milieu est estimé

par dépôt d'une infime quantité de milieu sur du papier pH universel. Les mêmes critères que pour les organogels sont appliqués ici pour l'obtention d'un gel.

- **Observations**

Dans notre cas, dès l'ajout de soude, un début de gélification a été observé. L'hydrogel obtenu est très stable dans le temps. L'aspect visuel est identique même au-delà de 6 mois.

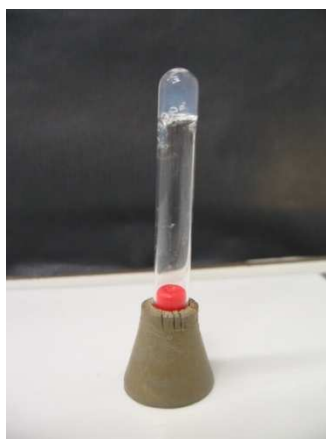


Figure 106 – Hydrogel obtenu selon les conditions 6 (voir tableau récapitulatif – Partie Expérimentale)

- **Analyses structurales**

- **Microscopie**

Le gel a été observé par Microscopie Electronique à Transmission (MET).

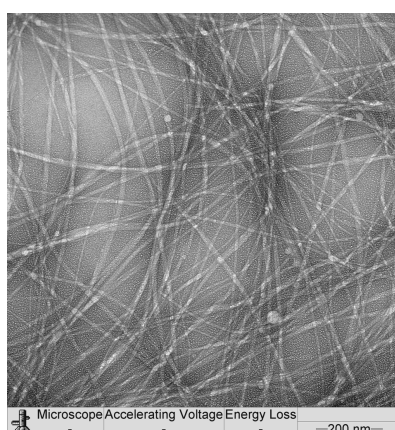


Figure 107 – Cliché de MET de l'hydrogel du dimère 72

L'observation met clairement en évidence la présence de fibres enchevêtrées formant un réseau tridimensionnel. Le diamètre moyen des fibres, évalué sur ce cliché, est de 10 nm, ce qui est relativement petit si on compare avec les valeurs de la littérature.²²⁵

– *Fluorescence et FT-IR*

Les spectres de fluorescence et FT-IR du gel sont représentés sur la Figure 108.

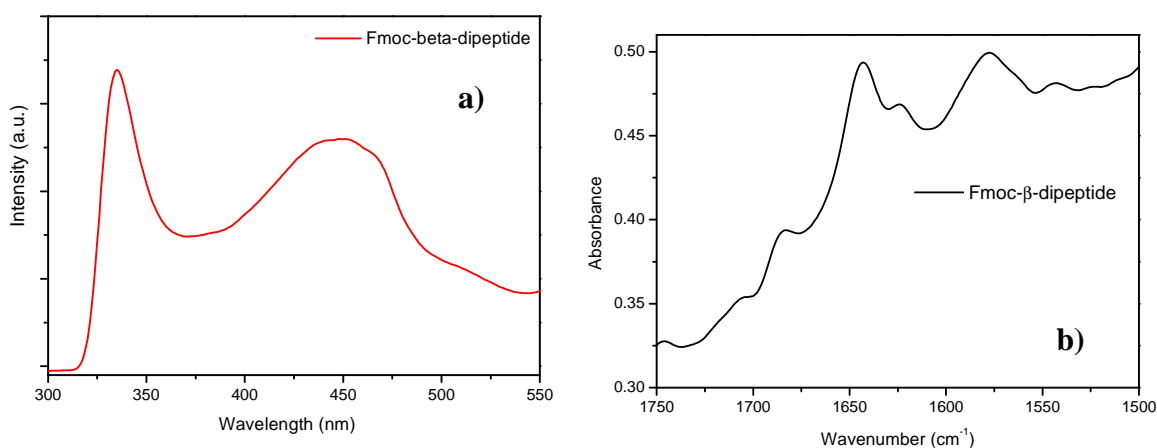


Figure 108 – Spectres de a) fluorescence et b) FT-IR de l'hydrogel de 72

Comme précédemment, on observe un pic d'émission de fluorescence maximum à 335 nm, ce qui correspond aux espèces de type excimère issues des groupes fluorényle. En outre, on observe également un pic d'émission relativement important à 452 nm correspondant à une forte *J*-agrégation des cycles fluorényles. Le groupement Fmoc participe donc bien au processus d'auto-assemblage tridimensionnel.

Le profil du spectre dans la zone des carbonyles suggère comme précédemment un arrangement de type feuillet β antiparallèle.

ii- Déclenchement enzymatique

Le dimère **70** totalement protégé a également pu être étudié dans le cadre de la formation d'hydrogel. Le but est d'utiliser un enzyme, de type esterase, afin de former l'acide carboxylique *in situ* au départ de l'ester correspondant par hydrolyse enzymatique. Peu de groupes de chercheurs ont d'ores et déjà travaillé sur cette thématique. Le groupe d'Uljin en fait partie.²²⁷ Les auteurs ont étudié l'hydrolyse enzymatique d'un certain nombre de dipeptides en présence de *Subtilisine* et ont pu, dans certains cas, observer la formation

d'hydrogels. Le déclenchement du processus de gélification par voie enzymatique présente certains avantages par rapport à un déclenchement par variation du pH ou de la température.

L'équipe du Professeur Ulijn s'est chargée de cette étude. Le dimère **70** a donc été traité par une protéase, la *Subtilisine*, à pH physiologique.²²⁷ Malheureusement, la formation d'un hydrogel n'a pas été observée. Le fait qu'on soit ici en présence d'un ester *tert*-butylique encombré en est peut-être la cause. La *Subtilisine* est connue pour pouvoir hydrolyser des esters d'alcools primaires tels que les esters méthyliques. Nous avons donc synthétisé l'analogue du dimère **209** en remplaçant l'ester *tert*-butylique par un ester méthylique.

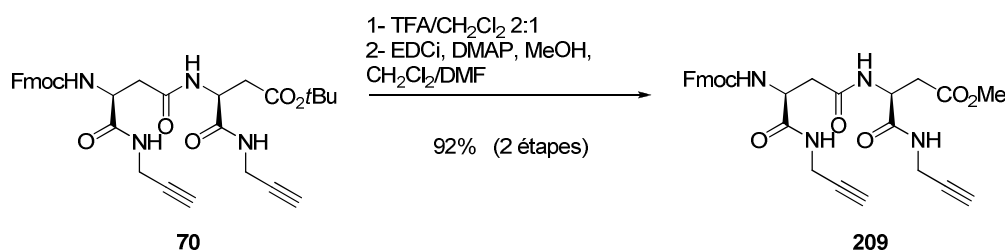


Schéma 85 – Accès au dimère 209

Le dimère **209** a donc été traité à pH physiologique par de la *Subtilisine*. Mais ici aussi, aucun hydrogel n'a pu être obtenu. Il se peut que la présence d'un groupement méthylène supplémentaire, dû au fait que nous sommes en présence d'un résidu de type β -aminoacide, soit à l'origine de cet échec.

Le dimère **209** a été étudié également pour la formation d'organogel. Mais, les essais réalisés se sont soldés par des échecs : quelles que soient les conditions testées, nous n'avons pas observé la formation de gel dans les solvants organiques. Le changement de groupements protecteurs semble avoir eu ici un effet significatif sur les propriétés d'auto-assemblage du composé. La littérature rapporte en effet que les groupements protecteurs jouent un rôle dans la formation d'organogels.²²⁸

2- Etude des composés glycoconjugués

L'équipe du Dr Alison Edwards ayant observé la formation de gel au départ d'aminoglycosides, il nous a semblé intéressant d'étudier les propriétés de gélification des structures glycoconjuguées dérivées de la famille « propargylamide » que nous avons synthétisées. Les objectifs que nous visons sont à terme de greffer les sucres sur le gel pré-formé. Ceci devrait nous permettre d'étudier d'un point de vue fondamental les modifications post-gélification

causées par l'introduction des sucres. De plus, cela élargit de façon significative le champ d'applications des gels ainsi obtenus contenant des sucres. Cette approche prend tout son intérêt dans le cas des hydrogels. Le groupe du Professeur Ulijn a, par exemple, réussi à greffer des unités galactose sur une surface de type hydrogel et il a été montré que cela rendait favorable l'attachement de cellules de foie (hépatocytes). Une telle matrice pourrait donc être utilisée comme milieu de culture cellulaire. La culture de cellules de foie présente un grand intérêt notamment pour l'étude de toxines. Par ailleurs, le groupe du Professeur Grant (Université de Strathclyde, Royaume-Uni) s'intéresse à la culture de cellules de foie à des fins thérapeutiques (reconstruction de tissus, tests toxicologiques). Les cellules de foie requièrent des conditions de culture et de prolifération assez drastiques. Les enjeux sont donc relativement intéressants.

Par ailleurs, il existe peu d'exemples de gels issus de composés présentant des ligations de type 1,2,3-triazole issues de « Click Chemistry ». ^{229,230,231} Comme précédemment, nous avons envisagé deux approches : organogel et hydrogel.

a- Organogel

i- Etude du dimère 142

Dans un premier temps, nous avons étudié le dimère glycoconjugué **142** Il s'est avéré qu'il formait un gel par déclenchement thermique. La présence de deux unités saccharidiques, apportant pourtant un encombrement supplémentaire, ne semble pas poser de problème au cours du processus d'assemblage tridimensionnel des molécules.

- ***Conditions expérimentales et observations***

5,4 mg de dimère **142** ont été solubilisés dans 0,5 mL de toluène. Le chauffage du milieu provoque une solubilisation totale du composé. Un refroidissement lent à température ambiante et un passage aux ultrasons pendant 5 min entraîne la gélification du milieu.

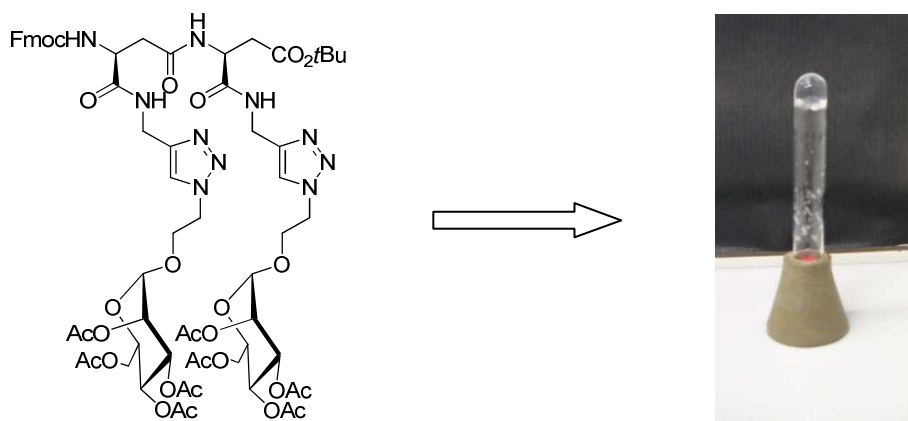


Figure 109 – Organogel formé au départ du dimère glycoconjugué 142

- *Analyses structurales*

- *Fluorescence et FT-IR*

Les spectres de fluorescence et FT-IR du gel sont représentés sur la Figure 110.

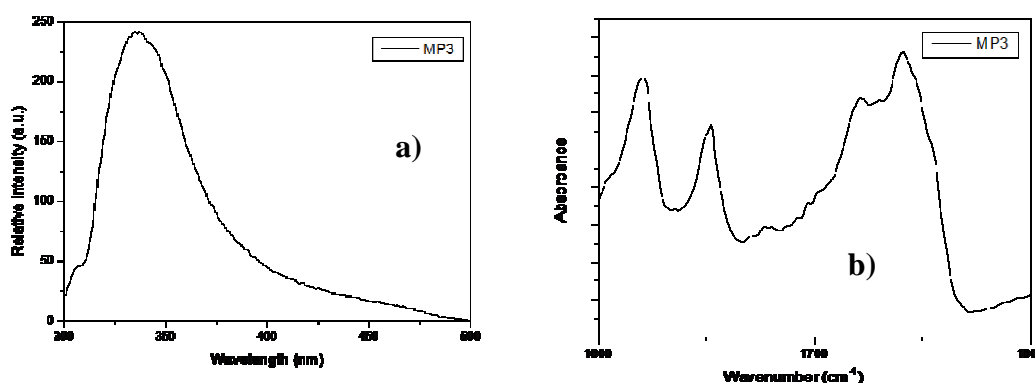


Figure 110 – Spectres de a) fluorescence et b) FT-IR de l'hydrogel de 142

On observe un pic d'émission de fluorescence maximum vers ~ 335 nm, ce qui correspond aux espèces de type excimère issues des groupes fluorényle, précédemment évoqués, ce qui suggère bien leur implication dans les phénomènes d'arrangement intermoléculaire aboutissant à la formation de l'organogel.

Le profil de la zone des carbonyles ($1500-1750$ cm^{-1}) permet la mise en évidence d'un arrangement de type feuillet parallèle, accompagné d'une population d'arrangements aléatoires (random coil).

ii- Etude du monomère 141

Par la suite, nous avons décidé d'étudier le monomère glycosylé correspondant **141**. Nous souhaitons étudier l'influence de la longueur du squelette peptidique sur les propriétés de gélification.

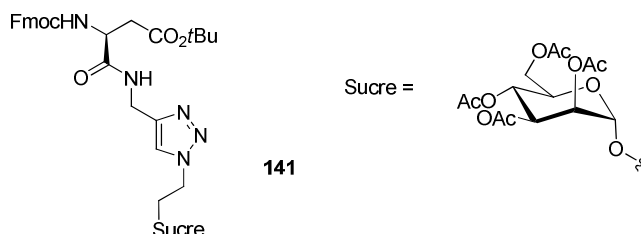


Figure 111 – Etude du monomère glycoconjugué **141**

Le composé étant, dès le départ, totalement soluble dans le toluène, nous n'avons pas réussi à former de gel dans ces conditions. Il semblerait donc qu'il y ait une densité minimale en liaisons amide nécessaire pour la formation d'un nombre suffisant de liaisons hydrogène intermoléculaires. Dans notre cas, la présence de l'unité saccharidique n'a pas permis d'équilibrer la balance entre la formation de liaisons hydrogène et les interactions π - π .

b- Hydrogel

i- Etudes du dimère 210

Suite à l'obtention de l'organogel au départ du dimère glycoconjugué **142**, nous avons décidé d'étendre l'étude à la formation d'hydrogel au départ de la forme acide. Le composé **210** est obtenu par déprotection quantitative de l'acide en présence de TFA dans le dichlorométhane.

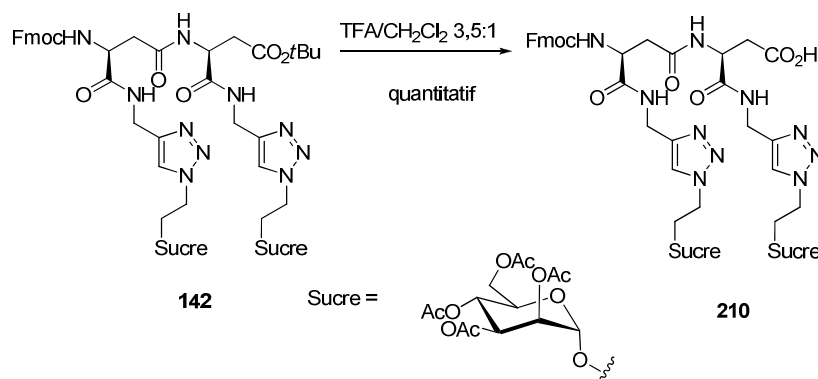


Schéma 86 – Accès au dimère acide **210**

Nous avons ensuite tenté de former un hydrogel en appliquant la même méthodologie que pour le dimère **72** à savoir par déclenchement par variation du pH. Mais, dans ces conditions, nous n'avons jamais observé la formation d'hydrogel.

Il avait été envisagé d'étudier le même dimère où tous les sucres auraient été au préalable désacétylés. Mais comme on l'a vu, la présence du groupement Fmoc pose problème lors de la désacétylation dans les conditions de Zemplén (MeONa, MeOH). Le composé n'a donc pas pu être obtenu.

ii- Etude du monomère **148**

Bien que le monomère glycoconjugué **141** n'ait pas formé d'organogel, nous avons voulu tester ses propriétés pour la formation d'hydrogel. La forme acide du composé a été obtenue précédemment par traitement du monomère **141** par du TFA dans CH₂Cl₂.

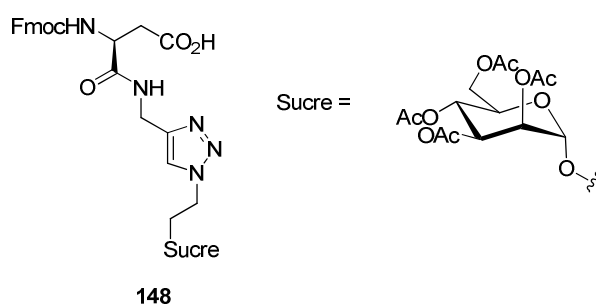


Schéma 87 – Monomère glycoconjugué 148

L'application des conditions de gélification par déclenchement par variation du pH ne nous a pas permis de former l'hydrogel.

Conclusion

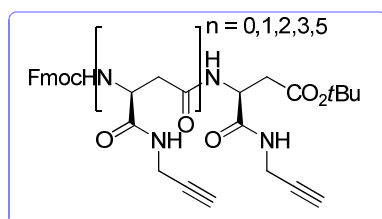
Nous avons obtenu des résultats très encourageants pour la formation d'organogel et d'hydrogel au départ de β -dipeptides, glycosylé ou non ; c'est pourquoi ces études vont être poursuivies. Nous envisageons notamment d'étudier les modifications structurales post-gélification, engendrées par le greffage de molécules sur un gel pré-formé. Ceci devrait permettre d'évaluer dans quelle mesure il est possible de conserver la structure du gel en fonction de la nature des molécules greffées afin de maintenir la balance entre hydrophilie et lipophilie, équilibre indispensable au processus de gélification.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

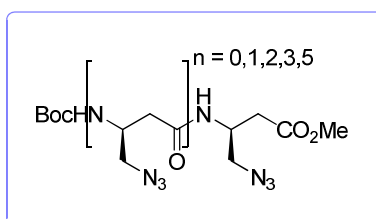
Un des objectifs de ce travail de thèse portait sur la synthèse d'édifices β -peptidiques glycoconjugués devant servir de structure de base pour la synthèse de composés plus complexes destinés à être utilisés en immunothérapie anticancéreuse. Les épitopes Tn devaient pouvoir être greffés sur des plateformes présentatrices β -peptidiques par des méthodes de ligation chimique. Pour ce faire, nous devons obtenir ces plateformes de la manière la plus convergente possible.

Nous avons donc synthétisé trois types d'oligomères correctement fonctionnalisés, destinés à deux types de ligation chimique.

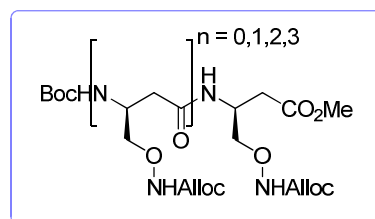
Le premier type de ligation envisagé était de type 1,2,3-triazole obtenu par réaction de Cycloaddition catalysée au cuivre entre un alcyne et un azoture (CuAAC). Nous avons donc réussi à synthétiser deux familles complètes, du monomère à l'hexamère. Ces deux séries d'oligomères diffèrent par la nature de la chaîne latérale, fonctionnalisée soit sous forme de propargylamide, soit sous forme d'azoture. Les rendements atteints pour l'ensemble de ces deux séries sont très satisfaisants. La série « propargylamide » a demandé un travail de méthodologie plus prononcé, du fait de problèmes rencontrés avec certains groupements protecteurs et de problèmes d'insolubilité récurrents (présence d'amides latéraux supplémentaires, caractère intrinsèque des β -peptides).



série "propargylamide"



série "azoture"



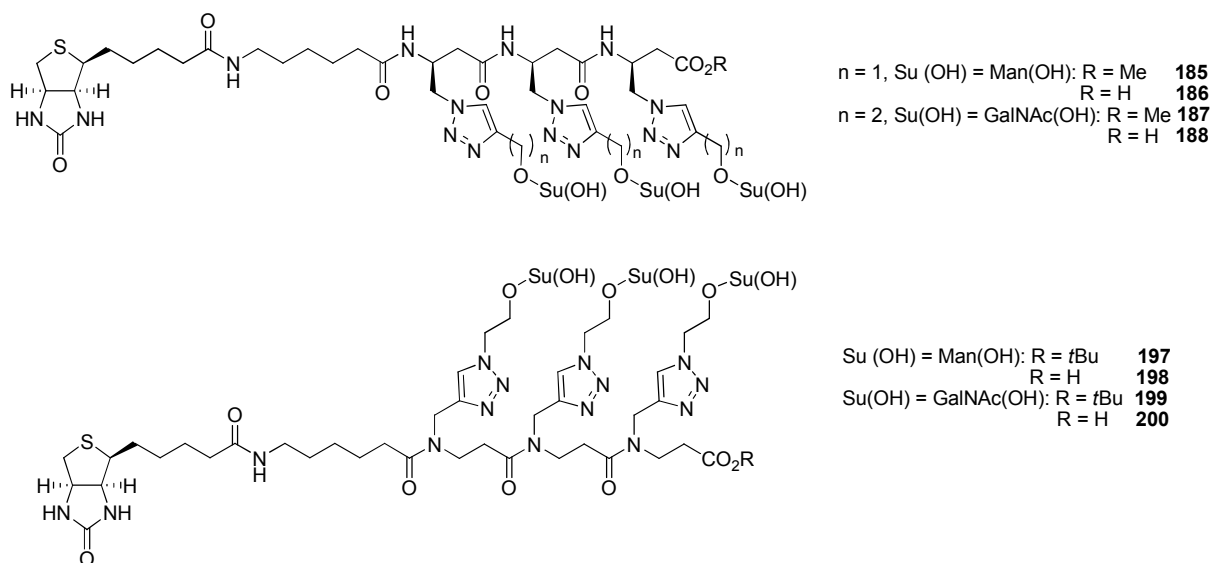
série "oxime"

Le second type de ligation que nous avons envisagé était une ligation de type oxime. Dans ce cas, nous avons choisi de fonctionnaliser la plateforme β -peptidique par des groupements aminoxy. L'obtention des oligomères de cette série nous a posé un certain nombre de problèmes, notamment au niveau de l'obtention des précurseurs acides et au niveau des étapes de couplage qui ont demandé un travail d'optimisation des conditions réactionnelles. Nous avons tout de même réussi à synthétiser les oligomères jusqu'au tétramère, avec des rendements acceptables. Dans l'avenir, cette voie de synthèse fera l'objet d'un approfondissement afin d'obtenir les oligomères avec des conditions optimisées.

Parallèlement à ces travaux, nous avons synthétisé les épitopes Tn **116** et **117**, correctement fonctionnalisés pour être greffés sur les plateformes

Ayant en notre possession les plateformes et les unités saccharidiques adaptées, nous avons réussi à obtenir les composés glycoconjugués avec de très bons voire d'excellents rendements. Nous avons inclus dans nos travaux des plateformes de type β -peptïde, dont la synthèse a été mise au point dans l'équipe.

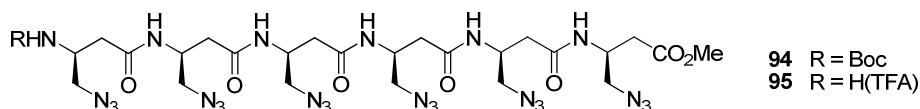
Pour le volet « Immunothérapie antitumorale », l'épitope Tn a été greffé sur des oligomères trimériques. Différentes structures ont ainsi été obtenues par couplage de ces composés glycoconjugués avec de la biotine, par l'intermédiaire d'un bras espaceur.



La famille « propargylamide » a posé quelques problèmes et n'a pas pu être incluse dans la série de tests de reconnaissance antigène-anticorps. L'évaluation de l'antigénicité de ces structures issues des familles « azoture » et « peptïde » a montré une très bonne reconnaissance par deux anticorps monoclonaux, que l'extrémité C-terminale soit sous forme d'ester ou d'acide. Les résultats, tout à fait conformes à ce que l'on peut observer dans la littérature, étaient le point de départ incontournable pour la suite du projet. A plus ou moins long terme, les composés glycoconjugués synthétisés pourront être intégrés dans des édifices plus complexes, greffés à l'immunoadjuvant Pam₃-Cys-OH ou encore à un épitope spécifique des cellules T. Ces structures pourront alors être testées *in vitro* puis à terme *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel à induire une réponse immunitaire efficace et durable.

La seconde partie de mes travaux de thèse portait sur l'étude des propriétés de structuration des β -peptides obtenus. Nous avons effectué une analyse conformationnelle sur les oligomères des séries « azoture » et « propargylamide ». Dans le premier cas, les résultats obtenus par RMN, IR et dichroïsme circulaire, tendent à démontrer que l'hexamère **94** adopte une préférence conformationnelle marquée en solution. Le profil des courbes de dichroïsme

semble être caractéristique d'une structuration en hélice H-14, mais des expériences complémentaires laissent penser qu'elle ne serait pas stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaire. La solubilité limitée de ce composé nous a poussés à synthétiser son analogue déprotégé au niveau de l'extrémité *N*-terminale **95**.



Nous avons récemment obtenu l'hexamère **95**. A la date de rédaction du présent manuscrit, l'étude de ce composé est en cours, mais on peut d'ores et déjà apercevoir, sur la base du spectre RMN ^1H , des signes potentiels de structuration. Suivront naturellement des études plus poussées par RMN et par dichroïsme circulaire, accompagnées de modélisation moléculaire afin de déterminer la nature de cette structuration secondaire. Dans la série « propargylamide », les problèmes de solubilité ont restreint l'étude au dimère et au trimère. L'étude de ce dernier par RMN, et notamment par NOESY et par titration au DMSO- d_6 , a permis de mettre en évidence un possible début de repliement de la molécule. Dans ce cas particulier, afin de pouvoir poursuivre l'analyse conformationnelle de ces oligomères originaux de part la présence des chaînes latérales propargylamide, il conviendrait par la suite d'introduire des groupements aidant à la solubilité.

A côté des objectifs qui m'étaient fixés, certains oligomères de la série « propargylamide » ont été étudiés pour leur tendance surprenante à former des gels. A l'issue de ces études, nous avons réussi à former un organogel au départ du dimère « propargylamide » **70**. La forme acide **72** de ce dimère a montré une tendance à former un hydrogel particulièrement stable dans le temps. Nous avons également étudié le potentiel de gélification de structures glycoconjuguées et nous sommes parvenus à former un organogel au départ du dimère glycosylé **142**. La suite à donner au projet consistera notamment en l'étude de modifications post-gélification. Il s'agira d'analyser les conséquences générées par le greffage de molécules ou de sucres sur des gels pré-formés. Les travaux à ce sujet ont déjà débuté avec la synthèse d'un fluorochrome devant permettre de localiser les zones de fixation sur le gel.

PARTIE
EXPERIMENTALE

I- Généralités

1- Solvants, réactifs et chromatographies

Les **solvants et réactifs anhydres** sont obtenus par distillation sous argon comme suit :

- CH₃CN, CH₂Cl₂, MeOH, Et₃N, 2,4,6-collidine : distillés sur CaH₂ et stockés sur tamis moléculaire 4Å,
- THF : distillé sur potassium avec de la benzophénone et stocké sur tamis moléculaire 4Å,
- Toluène : séché sur fils de sodium,
- DMF : qualité « peptide synthesis » et stocké sur tamis moléculaire 4Å.

Les **chromatographies sur couche mince (CCM)** ont été réalisées sur des plaques de silice KIESELGEL 60 F₂₅₄ (MERCK) en aluminium ou en verre. L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas. La révélation des plaques est, dans un premier temps, effectuée par fluorescence UV à 254 nm, puis complétée par l'utilisation de révélateurs chimiques :

- ninhydrine, vanilline, KMnO₄ pour les aminoacides et les peptides
- acide sulfurique 30%/MeOH et vanilline pour les sucres.

Les **purifications par chromatographie sur gel de silice** sont effectuées avec de la silice flash (40-63 µm MERCK) et des faibles pressions d'air. L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas.

Les **spectres HPLC analytique** ont été réalisés sur un appareil DIONEX (TCC-100, 25°C ; pompes P580), couplé à un détecteur UVD340U. Les séparations ont été réalisées en phase inverse avec une colonne ACCLAIM 120 (C18, 5 µm, 120 Å, 4,6 x 250 mm). Les purifications par **HPLC préparative** ont été effectuées sur un appareil VARIAN (pompe Prestar 218), couplé à un détecteur à barrettes de diodes VARIAN ProStar 355RI. Les séparations HPLC analytiques sont réalisées en phase inverse (C18, 8 µm, 250 x 4,6 mm) et les séparations HPLC préparatives sont réalisées en phase inverse (C18, 8 µm, 250 x 41,4 mm). Le facteur de scale up utilisé est de 81.

2- Analyses

Les **points de fusion (PF)** ont été déterminés sur un microscope à plaque chauffante REICHERT et ne sont pas corrigés.

Les **pouvoirs rotatoires** $[\alpha]_D^T$ ont été mesurés sur un polarimètre JASCO DIP-370, à une longueur d'onde de 589 nm (raie D du sodium), dans une cuve de 10 cm, à une température mesurée **T** (°C), en utilisant des concentrations (*c*) en g/100mL.

Les **spectres infrarouges (IR)** ont été réalisés sur un appareil PERKIN-ELMER 881 (échantillons utilisés purs entre deux fenêtres de NaCl, pour les liquides, ou sous forme de pastille de KBr, pour les solides) ou sur un appareil SHIMADZU FTIR-8400S équipé d'un module ATR (échantillons utilisés purs). Les échantillons sont déposés purs sur un cristal de germanium. Les nombres d'onde (ν) sont exprimés en cm^{-1} . Dans le cadre de l'analyse conformationnelle en solution, les spectres ont été enregistrés avec 64 scans, avec utilisation d'une cellule en NaCl de chemin optique 1 mm. Les composés étudiés sont solubilisés dans du chloroforme de qualité spectroscopique (ACROS ORGANICS 99+%, stabilisé sur amylène). Le spectre de chaque composé (C) est obtenu par traitement informatique par soustraction du spectre du solvant pur (S) au spectre de l'échantillon (C+S).

Pour l'analyse des gels, les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 2000 FT-IR, avec 32 scans, entre 4000 et 400 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} et un intervalle de 1 cm^{-1} . Les gels à une concentration donnée sont placés entre deux plaques de cristal de ZnSe.

Les **spectres de masse** sont réalisés en mode électrospray positif (**ESI⁺**) sur un spectromètre Qtof-micro WATERS (3000V) en utilisant une calibration interne (H_3PO_4^+). Les spectres de masse haute résolution (**ESI-HR-MS**) sont réalisés avec une calibration externe (leucine encéphaline $m/z = 556,2771$) pour les échantillons de bas poids moléculaire et avec d'autres composés polychargés pour les échantillons de haut poids moléculaire. Dans le cas de spectres de masse couplés à une chromatographie liquide (**LC-MS**), les séparations HPLC sont réalisées en phase inverse sur un système ALLIANCE WATERS (colonne C18, 5 μm , 100 mm x 2,1 mm) couplé à un détecteur à barrettes de diodes, avec un gradient d'élution eau/acétonitrile (95:5 (t=0min) → 5:95 (t=15min) → 5:95 (t=20min) → 95:5 (t=35min)) et un débit de 0,2 mL.

Les **spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)** ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AVANCE 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) ou BRUKER AVANCE 500 (pour les expériences de NOESY). Les spectres ^{13}C sont en général réalisés avec une séquence Jmod. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm), en prenant pour référence le signal résiduel du solvant deutéré utilisé, qui est précisé dans chaque cas. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz).

Les abréviations employées pour décrire la multiplicité des signaux sont les suivantes :

s : singulet	t : triplet
se : singulet élargi	td : triplet dédoublé
d : doublet	q : quadruplet
dd : doublet de doublet	qu : quintuplet
ddd : doublet de doublet de doublet	m : multiplet et massif

L'attribution des spectres ^1H et ^{13}C a été effectuée à partir d'expériences à deux dimensions (COSY, HSQC...). Dans le cas des oligomères, des expériences de TOCSY ont été réalisées pour identifier les protons appartenant à chaque unité d'HMBC afin de déterminer la séquence. Les spectres de NOESY ont permis de confirmer certaines attributions et sont utilisés pour l'analyse conformationnelle.

Nb : dans CD_3OD et D_2O , les protons d'amide, échangeables, ne sont pas visibles.

Les **spectres de dichroïsme circulaire** sont enregistrés sur un spectropolarimètre JASCO J-715, adapté avec un porte-échantillon thermostaté à 20°C . Les échantillons sont introduits dans une cellule de mesure cylindrique SUPRASIL en quartz, de chemin optique 1,0 cm. Les solvants utilisés sont le 2,2,2-trifluoroéthanol et le méthanol (ROMIL, qualité supérieure). Les échantillons sont préparés à des concentrations appropriées afin d'éviter tout phénomène de saturation du détecteur ou d'agrégation. Le spectre de référence pour la ligne de base est enregistré avec le solvant pur dans la même cellule et sera soustrait au spectre de l'échantillon. Le spectre obtenu est normalisé par rapport au chemin optique et à la concentration pour donner l'ellipticité molaire $[\theta]$, exprimée en $\text{deg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{dmol}^{-1}$. Pour l'étude des oligomères, les valeurs d'ellipticité molaire ont été normalisées par rapport au nombre de résidus pour donner la MRE (Mean Residue Ellipticity), exprimée en $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$.

Les **spectres d'émission de fluorescence** des gels ont été enregistrés sur un spectrofluoromètre JASCO FP-6500 avec une lumière mesurée orthogonalement à la lumière

excitatrice, avec une vitesse de scan de $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, avec une excitation à 280 nm et une gamme d'émission entre 300 nm et 500 nm. Une réponse moyenne est mesurée avec une largeur de bande de 10 nm et un pas d'acquisition de 1 nm.

Etude par **Microscopie Electronique à Transmission** des gels. Des grilles de cuivre (No. 400), recouvertes de carbone sont soumises à un traitement de « glow discharge » pendant 5 secondes et placées, face luisante dirigée vers le bas sur la surface d'une goutte de $10 \mu\text{L}$ d'échantillon contenant 5 mmol/L de gel pendant moins de 5 secondes. Les grilles ainsi chargées sont immédiatement placées sur une goutte de ddH_2O de $10 \mu\text{L}$ pendant 60 secondes et séchées. Les grilles lavées sont alors placées sur une goutte de $10 \mu\text{L}$ d'une solution fraîchement préparée et filtrée d'acétate d'uranyle (2% w/v) pendant 60 secondes avant d'être séchées de façon continue contre un papier filtre Whatman 50. Les données sont enregistrées à 120 kV sur un microscope électronique à transmission Zeiss LEO 912 à 30 eV.

Les **tests de reconnaissance antigène-anticorps** ont été réalisés sur des plaques de microtitration 96 puits (Nunc, roskilde, Danemark) qui ont été au préalable recouvertes avec $0,1 \mu\text{g}$ de streptavidine par puits d'antigène dans une solution tampon carbonate à 50 mM (pH 9,6) et incubés pendant la nuit à 4°C . Après lavage avec du PBS contenant 0,1% de tween 20, les composés biotinylés à $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ dans une solution tampon (PBS + 0,1% de tween 20 + 1% BSA) sont ajoutés aux puits pour 2h à 37°C . Après 3 lavages, plusieurs dilutions de mAb sont ajoutées pendant 1h. Ensuite, après lavages, les puits sont traités pendant 1h à 37°C avec des IgG ou IgM de type chèvre anti-souris conjugués avec de la peroxydase (Sigma, St Louis, Mo) puis un mélange O-phenylènediamine/ H_2O_2 est ajouté comme substrat. Les plaques sont ensuite lues par photométrie à une densité optique de 492 nm sur un lecteur automatique de plaques ELISA. (Dynatech, Marnes la Coquette, France).

3- Procédures générales

1. Déprotection d'amine protégée sous forme Boc

L'amine protégée (1,0 mmol) est traitée par 3 mL d'un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (1:1), à 0°C pendant 1h30. Le milieu est concentré sous vide. L'excès de TFA est éliminé par solubilisation du résidu dans 30 mL de CH_2Cl_2 puis évaporation sous vide. L'opération est répétée plusieurs fois. L'amine obtenue sous forme de trifluoroacétate d'ammonium est utilisée sans purification.

2. Déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc

Procédure 1

L'amine protégée (1,0 mmol) est traitée par 7 mL d'un mélange CH₃CN/Et₂NH (2:1) à 0°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant 30 min. Les solvants sont évaporés sous vide. L'excès de Et₂NH est éliminé par solubilisation du résidu dans 40 mL de CH₂Cl₂ puis évaporation sous vide. L'opération est répétée plusieurs fois. L'amine obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice.

Procédure 2

L'amine protégée (1,0 mmol) est traitée par 22,4 mL d'un mélange DMF/Pipéridine (8:2) à température ambiante pendant 1h30. Les solvants sont évaporés sous vide. L'amine obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice.

3. Saponification d'ester méthylique CO₂Me

Une solution d'ester (1,0 mmol – 1,0 éq.) dans 29,8 mL d'un mélange THF/H₂O/MeOH (3:1:1) est traitée à température ambiante par 0,125 mg de LiOH.H₂O (3,0 mmol – 3,0 éq.). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 2h. Les solvants sont évaporés sous vide et le résidu, solubilisé dans 30 mL d'H₂O, est lavé par 15 mL d'AcOEt. La phase aqueuse est acidifiée par HCl 1N jusqu'à pH = 2 puis extraite par AcOEt (3x100 mL). Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous vide.

4. Déprotection d'acide carboxylique protégé sous forme d'ester de *tert*-butyl (CO₂tBu)

L'ester (1,0 mmol) est traité par 23 mL d'un mélange TFA/CH₂Cl₂ (6:4) à 0°C pendant 2h. Les solvants sont évaporés sous vide. L'excès de TFA est éliminé par solubilisation du résidu dans 30 mL de CH₂Cl₂ puis par évaporation, l'opération étant répétée plusieurs fois. L'acide obtenu est utilisé sans purification.

5. Procédure générale de couplage peptidique utilisant EDCi/HOBt

Procédure 1

Une solution de trifluoroacétate d'ammonium (1,0 mmol) dans 12 mL de CH₂Cl₂ (*qsp* 0,08 mol/L) est traitée sous atmosphère inerte par 0,167 mL de triéthylamine (1,2 mmol – 1,2 éq.) à 0°C pendant 10 min. L'acide carboxylique (1,0 mmol – 1,0 éq.) est ajouté au milieu, à 0°C, suivi de 0,162 mg d'HOBt.H₂O (1,2 mmol – 1,2 éq.) et 0,232 mg d'EDCi.HCl (1,2 mmol – 1,2 éq.). Le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 8h. Les traitements après réaction sont décrits dans chaque cas.

Procédure 2

L'amine libre (1,0 mmol) et 0,189 g d'HOBt.H₂O (1,2 mmol – 1,2 éq.) sont ajoutés à 0°C, sous atmosphère inerte à une solution d'acide carboxylique (1,0 mmol – 1,0 éq.) dans 5 mL de CH₂Cl₂. Le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 10 min et 0,286 g d'EDCi.HCl (1,2 mmol – 1,2 éq.) est ajouté. L'agitation est maintenue pendant 8h à température ambiante. Les traitements après réaction sont décrits dans chaque cas.

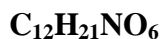
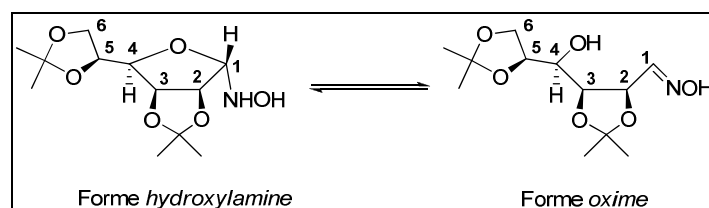
6. Procédure générale de couplage peptidique utilisant HATU/2,4,6-collidine

Une solution d'amine libre (1,0 mmol) et d'acide carboxylique (1,0 mmol – 1,0 éq.) dans 200 mL d'un mélange CH₂Cl₂/DMF est traitée à température ambiante, sous atmosphère inerte, par 0,157 mL de 2,4,6-collidine (1,25 mmol – 1,25 éq.) puis par 0,372 g d'HATU (1,0 mmol – 1,0 éq.). L'agitation est maintenue pendant 12h et les solvants sont évaporés sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice.

7. Procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire (CuAAC)

A une solution d'alcyne (1,0 mol) et d'azoture (1,0 mol – 1,0 éq.) dans 6,2 mL de DMF sont successivement ajoutés 1,6 mL d'une solution aqueuse de CuSO₄ 0,1M (0,160 mol – 0,16 éq.) et 4,8 mL d'une solution aqueuse d'acide ascorbique 0,1M (0,479 mol – 0,48 éq.), à température ambiante, sous atmosphère inerte. Après disparition des réactifs (suivi CCM), le DMF est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans CH₂Cl₂ puis lavé par H₂O (3x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice.

5-((R)-((S)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)(hydroxy)méthyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane-4-carbaldéhyde oxime (35)



275,30 g/mol

A une solution de D-mannose (25,0 g – 138,8 mmol) dans 277 mL d'acétone, le P_2O_5 (4,74 g – 33,4 mmol) est ajouté par portions, sous atmosphère inerte, à température ambiante. Le milieu est maintenu sous agitation pendant la nuit. De l'hydroxyde de calcium (18,5 g – 249 mmol) et du charbon actif (9,23 g) sont ajoutés au milieu qui est agité pendant 20 min supplémentaires puis filtré sur célite et concentré sous vide pour donner 35,4 g de 2,3-5,6-di-*O*-isopropylidène-D-mannose-lactol qui est utilisé sans purification ($\text{rdt}_{\text{brut}} = 98\%$). Le chlorhydrate d'hydroxylamine (13,9 g – 200 mmol) et le NaOAc (16,4 g – 120,0 mmol) sont ajoutés à une solution de lactol (35,4 g – 136,0 mmol) dans 187 mL d'EtOH absolu. Le mélange est chauffé à 65 – 70°C pendant 1h puis concentré sous vide. Le résidu est solubilisé dans 250 mL d'AcOEt et lavé par 125 mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 . La phase aqueuse est contre-extraite par AcOEt (2x). Les phases organiques sont réunies, lavées par de la saumure, séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous vide. On obtient 29,8 g d'oxime **35** (29 g – 108 mmol) qui est utilisée sans purification ($\text{rdt}_{\text{étape}} = 80\%$).

Rendement : brut 78 % (2 étapes)

CCM : $R_f = 0,60$ (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

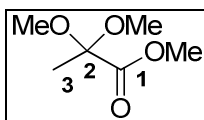
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3375 ; 3281 (N-H, O-H, ν), 2999 ; 2978 ; 2939 ; 2895 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, ν),.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 1,23 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène) ; 1,28 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène) ; 1,43 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène) ; 3,15 (t, 1H, $J_{\text{H}_4\text{-H}_5} = 7,0$ Hz, H_4) ; 3,84 (m, 1H, H_6) ; 3,91 (m, 2H, H_5 , H_6) ; 4,48 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3\text{-H}_4} = 0,8$ Hz, $J_{\text{H}_3\text{-H}_2} = 7,8$ Hz, H_3) ; 4,63 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, CHOH) ; 5,18 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2\text{-H}_1} = 4,2$ Hz, $J_{\text{H}_2\text{-H}_3} = 7,7$ Hz, H_2) ; 6,92 (d, 1H, $J_{\text{H}_1\text{-H}_2} = 4,1$ Hz, H_1) ; 11,13 (d, 1H, $J = 0,5$ Hz, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 24,6 ; 25,3 ; 26,0 ; 26,8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène) ; 66,2 (C_6) ; 69,5 (C_4) ; 71,6 (C_2) ; 75,4 (C_5) ; 76,8 (C_3) ; 108,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène) ; 149,9 (C_1 forme oxime).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰⁵

2,2-diméthoxypropionate de méthyle (**36**)



148,16 g/mol

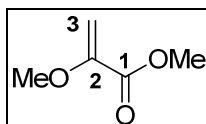
Une solution de pyruvate de méthyle (22,0 g – 220 mmol), de triméthylorthoformate (30,9 mL – 280 mmol) et d'acide sulfurique concentré (0,1 mL) dans 60 mL de MeOH anhydre est chauffé à reflux pendant 5h jusqu'à distillation de 40 mL de MeOH. Le milieu est refroidi à 10°C et versé sur une solution de KOH (0,600 g dans 300 mL). La solution est extraite par AcOEt (3x). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par distillation sous vide ($\theta_{\text{éb}} = 65 - 66^\circ\text{C}$ sous 8 torr) pour donner 24,5 g de 2,2-diméthoxypropionate de méthyle **36** (sous forme d'un huile incolore).

Rendement : 77 %

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,49 (s, 3H, CH₃) ; 3,26 (s, 6H, OCH₃), 3,78 (s, 3H, CH₃ CO₂Me).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰⁶

2-méthoxyacrylate de méthyle (37)



116,12 g/mol

Un mélange de 2,2-diméthoxypropionate de méthyle (21,04 g – 0,142 mol) et d’APTS (0,421 g – 0,0022 mol) est chauffé à 140 °C afin d’éliminer le MeOH par distillation. Le milieu est ensuite chauffé à 151-154°C afin d’obtenir par distillation 9,8 g de 2-méthoxyacrylate de méthyle **37** sous forme d’une huile incolore.

Rendement : 51 %

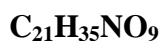
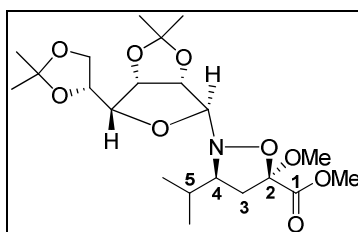
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 2951 ; 2918 ; 2833 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν), 1743 (C=O ester, ν) ; 1627 (C=C , ν) ; 1438 (C-H , δ) ; 1209 ; 1168 ; 1147 (C-O , ν) ; 1028 (C-O-C).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 3,64 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 3,80 (s, 3H, OCH_3) ; 4,61 (m, 1H, H_3) ; 5,34 (m, 1H, H_3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 49,8 (CH_3 CO_2Me) ; 55,4 (OCH_3) ; 93,5 (C_3) ; 151,5 (C_2) ; 163,5 (C_1).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰⁶

Isoxazolidine glycosylée (38)



445,50 g/mol

Une solution d’oxime **35** (1,0 g – 3,62 mmol), d’isobutyraldéhyde (0,261 g – 3,62 mmol) et de 2-méthoxyacrylate de méthyle **37** (0,841 g – 7,24 mmol) dans 18 mL de toluène anhydre est traitée par Bu_2SnO (0,045 g – 0,181 mmol) et chauffée à reflux (Dean Stark)

pendant 48h. Après retour à température ambiante, le toluène est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 15:85) pour donner l'isoxazolidine **38** (0,790 g – 1,77 mmol) sous forme d'un solide blanc.

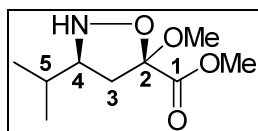
Rendement : 49 %

CCM : Rf = 0,68 (AcOEt/Cyclohexane 30 : 70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0,91 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, C(CH₃)₂) ; 0,96 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz, C(CH₃)₂) ; 1,36 ; 1,37 ; 1,41 ; 1,48 (4s, 12H, C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 1,96 (m, 1H) ; 2,45 (m, 1H) ; 2,53 (m, 1H) ; 3,10 (m, 1H ; 3,35 (s, 3H, CH₃O) ; 3,81 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,00 (dd, 1H, *J*_{H_{6su}-H_{5su}} = 4,5 Hz, *J*_{H_{6su}-H_{6'su}} = 8,7 Hz, H_{6su}) ; 4,08 (dd, 1H, *J*_{H_{6'su}-H_{5su}} = 6,3 Hz, *J*_{H_{6'su}-H_{6su}} = 8,6 Hz, H_{6'su}) ; 4,16 (dd, 1H, *J*_{H_{4su}-H_{3su}} = 3,6 Hz, *J*_{H_{4su}-H_{5su}} = 7,5 Hz, H_{4su}) ; 4,38 (ddd, 1H, *J*_{H_{5su}-H_{6su}} = 4,5 Hz, *J*_{H_{5su}-H_{6'su}} = 6,3 Hz, *J*_{H_{5su}-H_{4su}} = 7,6 Hz, H_{5su}) ; 4,50 (s, 1H, H_{1su}) ; 4,83 (dd, 1H, *J*_{H_{3su}-H_{4su}} = 3,7 Hz, *J*_{H_{3su}-H_{2su}} = 6,0 Hz, H_{3su}) ; 5,04 (d, 1H, *J*_{H_{2su}-H_{3su}} = 6,0 Hz, H_{2su}).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰²

3-isopropyl-5-méthoxyisoxazolidine-5-carboxylate de méthyle (**39**)



C₉H₁₇NO₄

203,24 g/mol

Une solution d'isoxazolidine **38** (0,450 g – 1,01 mmol) dans 10,1 mL de MeOH (*qsp* 0,1M en isoxazolidine) est traitée par un ajout lent d'acide perchlorique (0,12 mL – 2,02 mmol) à température ambiante puis chauffée à reflux pendant 5h. Après retour à température ambiante, le milieu (pH = 1) est neutralisé par ajout de Na₂CO₃ jusqu'à pH basique puis extrait par AcOEt (3x). Les phases organiques réunies sont lavées par de la saumure, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 70:30) pour donner un mélange de 2 diastéréoisomères **39** (0,164 g – 0,81 mmol) sous forme d'une huile légèrement jaune.

Rendement : 80 %

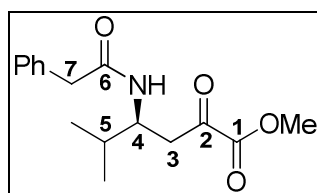
CCM : R_f = 0,2 (AcOEt/Cyclohexane 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *diastéréoisomère majoritaire* : 0,94 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, C(CH₃)₂) ; 1,00 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, C(CH₃)₂) ; 1,69 (m, 1H, H₂) ; 2,04 (m, 1H) ; 2,16 (m, 1H, H₅) ; 2,58 (m, 1H) ; 3,20 (m, 1H, H₄) ; 3,33 (s, 3H, CH₃O) ; 3,82 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) – *diastéréoisomère minoritaire* : 0,90 (d, 1H, *J* = 6,7 Hz, C(CH₃)₂) ; 0,99 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz, C(CH₃)₂) ; 2,47 (dd, 1H, *J* = 7,5 Hz, *J* = 13,2 Hz, H₃) ; 3,82 (s, 3H, CH₃ CO₂Me).

RMN ¹H (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 19,9 (CH₃) ; 20,1 (CH₃) ; 20,6 (CH₃) ; 27,9 (C₅ *mino*) ; 30,5 (C₅ *majo*) ; 45,0 (C₃ *mino*) ; 46,2 (C₃) ; 51,8 (OCH₃) ; 52,7 (CH₃ CO₂Me) ; 67,0 (C₄) ; 106, 3 (C₂) ; 165,8 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰²

5-méthyl-2-oxo-4-(2-phénylacétamido)hexanoate de méthyle (40)



C₁₆H₂₁NO₄

291,34 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution d'isoxazolidine déprotégée **39** (0,30 g – 1,48 mmol) dans 1,5 mL de *t*BuOH/H₂O (1:1) (*qsp* 0,1M en isoxazolidine) est traitée par de l'acide phénylpyruvique (0,27 g – 0,62 mmol) puis chauffée à 40°C pendant 19h. Le milieu est extrait par AcOEt (3x) et les phases organiques réunies sont lavées par de la saumure, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 50:50) pour donner un mélange de 2 diastéréoisomères **40** (0,198 g – 0,68 mmol) sous forme d'une huile légèrement jaune.

Rendement : 46 %

CCM : R_f = 0,29 (AcOEt/Cyclohexane 40:60)

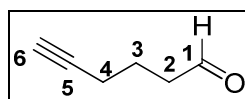
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3306 (N-H, ν) ; 3086 ; 3064 ; 3032 (C_{sp2}-H, ν) ; 2962 ; 2929 ; 2876 (C_{sp3}-H, ν) ; 1728 (C=O ester, ν) ; 1647 (C=O acrylate, ν).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0,77 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 0,83 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ; 1,76 (m, 1H, H_5) ; 2,75 (m, 1H) ; 3,02 (m, 1H) ; 3,53 (m, 2H) ; 3,87 (s, 3H, $\text{CH}_3 \text{CO}_2\text{Me}$) ; 4,07 (m, 1H, H_4) ; 5,48 (d, 1H, $J_{\text{NH-H4}} = 8,0$ Hz, NH) ; 7,23 – 7,35 (m, 5H, H_{Ar}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 17,9 (CH_3) ; 19,0 (CH_3) ; 31,7 (C_5) ; 41,4 (C_3) ; 43,4 (C_7) ; 52,1 ($\text{CH}_3 \text{CO}_2\text{Me}$) ; 53,1 (C_4) ; 127,7 ; 129,2 ; 129,5 (CH_{Ar}) ; 134,1 (C_{Ar}) ; 161,3 (C_1) ; 172,4 (C_6) ; 193,9 (C_2).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰²

5-hexynal (41)



$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$

96,13 g/mol

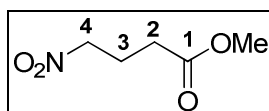
Une solution de DMSO (0,866 mL – 11,2 mmol) dans 2,6 mL de CH_2Cl_2 anhydre est ajoutée goutte à goutte à -50°C à une solution de chlorure d'oxalyle (0,51 mL – 5,6 mmol) dans 12,7 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Après 2 min, une solution de 5-hexyn-1-ol (0,56 mL – 5,09 mmol) dans 5,1 mL de CH_2Cl_2 anhydre est ajoutée au milieu en 5 min et l'agitation est maintenue pendant 15 min supplémentaires. Le milieu est neutralisé par ajout de 3,6 mL de Et_3N puis agité pendant 5 min. 25 mL d'eau sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 . Les phases organiques réunies sont successivement lavées par une solution saturée en NaCl, avec HCl 1N, de l'eau, avec une solution de NaHCO_3 puis une dernière fois par H_2O . La phase organique obtenue est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide pour donner le 5-hexynal **38** (0,474 g – 4,9 mmol) sous forme d'une huile.

Rendement : 97 %

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,85 (qu, 2H, $J = 7,1$ Hz, 2H_3) ; 1,97 (t, 1H, $J_{\text{H6-H4}} = 2,6$ Hz, H_6) ; 2,26 (td, 2H, $J = 2,6$ Hz, $J = 6,9$ Hz, 2H_2) ; 2,61 (m, 2H, 2H_4) ; 9,80 (d, 1H, $J = 1,1$ Hz, H_1).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰⁹

4-nitrobutanoate de méthyle (43)



147,13 g/mol

Sous atmosphère inerte, l'HMPT (0,43 mL – 2,32 mmol) est ajoutée à 0°C à une solution d'acrylate de méthyle (2,1 mL – 23,2 mmol) dans 25,1 mL de CH_3NO_2 . Le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 1h. L'HMPT et CH_3NO_2 sont évaporés sous vide avec précautions. Le produit brut obtenu est purifié par distillation Kügelrohr pour donner le 4-nitrobutanoate de méthyle (1,87 g – 12,8 mmol) sous forme d'une huile incolore.

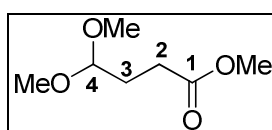
Rendement : 55 %

CCM : Rf = 0,65 (AcOEt/Cyclohexane 50 : 50)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 2,31 (qu, 2H, $J = 6,6$ Hz, , 2H₃) ; 2,47 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, 2H₂) ; 3,70 (s, 3H, $\text{CH}_3 \text{CO}_2\text{Me}$) ; 4,48 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, 2H₄).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁰⁹

4,4-diméthoxybutanoate de méthyle (44)



162,18 g/mol

Une solution de 4-nitrobutanoate de méthyle **43** (1,30 g – 8,84 mmol) dans 265 mL d'un mélange THF/MeOH 2:1 est traitée par KOH (2,48 g – 44,2 mmol) à température ambiante pendant 1h. Cette solution est ajoutée goutte à goutte à 0°C une solution de H_2SO_4 concentré (17,7 mL) dans 88,4 mL de MeOH. Le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 1h supplémentaire avant d'être concentré sous vide, le volume

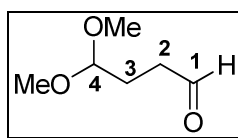
étant réduit de moitié. Le résidu obtenu est versé sur un mélange eau/glace et neutralisé par ajout d'une solution de NaOH 4N jusqu'à pH = 8. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂ (2x), séchée sur Na₂SO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par distillation Kügelrohr (86-88°C sous 15 torr) pour donner 1,05 g de 4,4-diméthoxybutanoate de méthyle (1,01 g – 6,28 mmol) sous forme d'une huile incolore.

Rendement : 71 %

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,92 (td, 2H, *J* = 5,6 Hz, *J* = 7,5 Hz, 2H₃) ; 2,34 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, 2H₂) ; 3,32 (s, 6H, OCH₃) ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,39 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz, H₄).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹¹¹

4,4-diméthoxybutanal (45)



132,16 g/mol

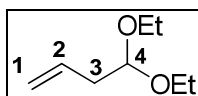
Le DIBAL-H (5,44 mL – 5,44 mmol, solution à 1,0M dans CH₂Cl₂) est ajouté goutte à goutte sous atmosphère inerte, à -78°C, à une solution d'ester **44** (0,700 g – 4,32 mmol) dans 33,6 mL de CH₂Cl₂ anhydre. La température du milieu est maintenue à -78°C jusqu'à disparition du réactif (suivi CCM). Le milieu est neutralisé par ajout de 0,42 mL de MeOH et de 1,7 mL d'une solution aqueuse saturée en Na₂SO₄ puis maintenu sous agitation pendant 18h. 2,09 g de Na₂SO₄ anhydre sont ajoutés au milieu qui est agité pendant 1h supplémentaire avant d'être filtré et les solides lavés au CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et concentrées sous vide pour conduire au 4,4-diméthoxybutanal (0,393 g – 2,98 mmol).

Rendement : 69 %

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,93 (m, 2H, 2H₃) ; 2,51 (td, 2H, *J* = 1,3 Hz, *J* = 7,2 Hz, 2H₂) ; 3,32 (s, 6H, OCH₃) ; 4,37 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz, H₄) ; 9,76 (s, 1H, H₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹¹³

4,4-diéthoxybut-1-ène (47)



144,21 g/mol

Dans un ballon tricol, muni d'un réfrigérant, d'une ampoule à brome et d'un thermomètre, une solution de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0,35 mL – 2,8 mmol) dans 7,0 mL d' Et_2O est traitée par $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (1,32 g – 4,1 mmol). L'éther vinylique (26,6 mL – 277 mmol) est ajouté goutte à goutte au milieu à une température maintenue à 42°C. Après retour naturel à TA, le milieu est neutralisé par ajout de 14 mL d'une solution de NaHCO_3 10 % et on observe une coloration vert olive. Le milieu est filtré sous vide et les solides sont lavés par Et_2O . La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par distillation sous vide (106°C sous 88 mmHg) pour donner le 4,4-diéthoxybut-1-ène (23,9 g – 166 mmol) sous forme d'une huile.

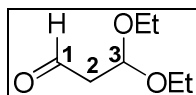
Rendement : 60 %

CCM : Rf = 0,82 (AcOEt/Cyclohexane 40:60)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,20 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 2,39 (m, 2H, 2H₃) ; 3,49 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,51 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,64 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,66 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 4,51 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, H₄) ; 5,09 (m, 2H, 2H₁) ; 5,80 (m, 1H, $J = 7,0$ Hz, $J = 10,2$ Hz, $J = 17,2$ Hz, H₂).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹¹⁶

3,3-diéthoxypropanal (48)



Une solution de 4,4-diéthoxybut-1-ène **47** (1,6 g – 11,1 mmol) dans 13,3 mL d'un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4: 1 est refroidie à -78°C et l'ozone est mis à barboter dans le milieu jusqu'à coloration bleue persistante au bout de 3-4h (saturation en O_3). Le courant d'ozone est remplacé par un courant d'argon jusqu'à ce que le milieu devienne incolore et la triphénylphosphine (3,2 g – 12,2 mmol) est ajoutée à -78°C en 2 ou 3 portions. La solution est alors maintenue sous agitation à température ambiante pendant 12h. Le solvant est évaporé sous vide sans chauffage. Les sels de triphénylphosphine sont précipités par ajout d'un mélange Pentane/ Et_2O (6:4) puis filtrés sous vide. Le filtrat est concentré sous vide sans chauffer. Le produit brut est purifié par flash chromatographie sur gel de silice (Pentane/ Et_2O 60:40) pour donner le 3,3-diéthoxypropanal **48** (1,13 g – 7,78 mmol) sous forme d'une huile incolore.

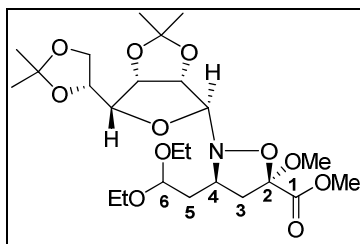
Rendement : 70 %

CCM : $R_f = 0,64$ (AcOEt/Cyclohexane 60:40)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,18 (t, 6H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 2,70 (dd, 2H, $J = 2,3$ Hz, $J = 5,4$ Hz, 2H_2) ; 3,52 (q, 1H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,54 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,65 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 3,67 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ; 4,94 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, H_3) ; 9,72 (t, 1H, $J = 2,3$ Hz, H_1).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹¹⁵

Isoxazolidine glycosylée (49)



519,58 g/mol

Une solution d'oxime **35** (1,18 g – 4,30 mmol), de 3,3-diéthoxypropanal **48** (0,570 g – 4,30 mmol) et de 2-méthoxyacrylate de méthyle **37** (1,0 g – 8,61 mmol) dans 21,5 mL de toluène anhydre est chauffée à reflux (Dean Stark) pendant 24h. Après retour à température ambiante, le toluène est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 15:85) pour donner l'isoxazolidine glycosylée **49** (0,804 g – 1,55 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 36 %

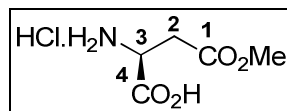
CCM : Rf = 0,70 (AcOEt/Cyclohexane 70:30)

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 2978 ; 2939 ; 2901 ; 2886 (Csp³-H, ν) ; 1753 (C=O ester, ν).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,19 (m, 6H, OCH₂CH₃) ; 1,35 ; 1,36 ; 1,41 ; 1,47 (4s, 12H, C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 1,83 (m, 1H, $J = 6,6$ Hz, $J = 13,7$ Hz, H₅) ; 2,09 (m, 1H, $J = 4,3$ Hz, $J = 7,7$ Hz, $J = 12,1$ Hz) ; 2,29 (m, 1H, $J = 3,0$ Hz, $J = 13,6$ Hz) ; 2,71 (m, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 13,6$ Hz) ; 3,36 (s, 3H, OCH₃) ; 3,49 (m, 2H, OCH₂CH₃) ; 3,61 (m, 3H, OCH₂CH₃, H₄) ; 3,80 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,06 (m, 2H, H_{6su}, H_{6'su}) ; 4,11 (m, 1H, H_{4su}) ; 4,36 (dt, 1H, $J = 5,4$ Hz, $J = 7,5$ Hz, H_{5su}) ; 4,54 (dd, 1H, $J = 4,3$ Hz, $J = 6,9$ Hz, H₆) ; 4,59 (s, 1H, H_{1su}) ; 4,82 (dd, 1H, $J_{H3su-H4su} = 3,7$ Hz, $J_{H3su-H2su} = 6,0$ Hz, H_{3su}) ; 5,01 (d, 1H, $J_{H2su-H3su} = 6,1$ Hz, H_{2su}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 15,2 (OCH₂CH₃) ; 24,6 ; 25,2 ; 26,0 ; 26,8 (C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 37,4 (C₅) ; 44,5 (C₃) ; 52,0 (OCH₃) ; 52,9 (CH₃ CO₂Me) ; 58,3 (C₄) ; 60,8 (OCH₂CH₃) ; 60,9 (OCH₂CH₃) ; 66,6 (C_{6su}) ; 73,2 (C_{5su}) ; 80,1 (C_{4su}) ; 82,4 (C_{3su}) ; 83,7 (C_{2su}) ; 97,8 (C_{1su}) ; 100,8 (C₆) ; 106,3 ; 109,1 (C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 112,4 (C₂) ; 169,3 (C₁).

Chlorhydrate d'ammonium d'acide (S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-méthoxy-4-oxobutanoïque (51)



C₅H₁₀ClNO₄

183, 59 g/mol

Du chlorure d'acétyle (22,4 mL – 315,6 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0°C sur 75 mL de MeOH et le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 30 min. Cette solution est ajoutée goutte à goutte à une suspension d'acide (L)-aspartique (30,0 g – 225,4 mmol) dans 75 mL de MeOH à 0°C. Le milieu est agité à 0°C pendant 2h puis à température ambiante pendant la nuit. Le milieu est alors versé sur 450 mL d'Et₂O froid. Après 2h, le précipité est filtré et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est dilué dans 36 mL MeOH et versé sur 52 mL d'Et₂O froid. Le mélange est laissé à refroidir pendant 2h puis filtré. On obtient 37,8 g de chlorhydrate **51** (37,7 g – 205 mmol) au total sous forme de solide blanc.

Rendement : 91%

CCM : R_f = 0,34 (CH₂Cl₂/MeOH 94:6)

PF : 185 – 187 °C

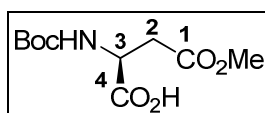
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3448 (N-H, ν) ; 3136 (OH acide) ; 2988 ; 2954 (C_{sp3}-H, ν) ; 1735 (C=O ester, C=O acide) ; 1654 ; 1637 (N-H, δ).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 2,96 (dd, 1H, *J*_{H2-H3} = 5,6 Hz, *J*_{H2-H2'} = 17,3 Hz, H₂) ; 3,02 (dd, 1H, *J*_{H2'-H3} = 5,6 Hz, *J*_{H2'-H2} = 17,3 Hz, H_{2'}) ; 3,64 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,16 (t, 1H, *J*_{H3-H2} = 5,6 Hz, H₃) ; 8,64 (se, 3H, NH₂.HCl).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 34,0 (C₂) ; 48,4 (CH₃ CO₂Me) ; 52,0 (C₃) ; 169,7 ; 169,5 (C₁, C₄).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹¹⁷

Acide (S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-méthoxy-4-oxobutanoïque (52)



247, 25 g/mol

L'ester **51** (2,05g – 11,17 mmol) est solubilisé dans 43,7 mL d'un mélange dioxane/eau 2:1 et traité à 0°C par de la triéthylamine (6,22 mL – 44,69 mmol) pour atteindre un pH de 9-10. Le Boc₂O (2,68 g – 12,30 mmol) est ensuite ajouté à 0°C et le milieu est agité à température ambiante pendant 12h. Le dioxane est éliminé sous vide. Le résidu est dilué dans 80 mL d'eau. Le pH doit être maintenu basique, si nécessaire par ajout de NaHCO₃. La phase aqueuse est lavée par de l'Et₂O (3x) puis acidifiée en présence d'une solution aqueuse d'HCl 1N jusqu'à pH = 2. Le produit est extrait par AcOEt (4x). Les phases organiques réunies sont lavées par de la saumure, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide pour donner 2,71 g (10,9 mmol) d'acide **52** sous forme d'une huile incolore.

Rendement : 98%

CCM : R_f = 0,64 (MeOH 100%)

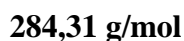
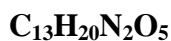
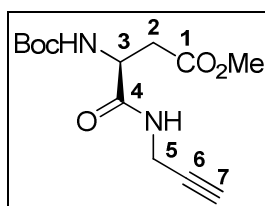
IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3360 (N-H, ν) ; 3135 (O-H acide, ν) ; 2980 (Csp₃-H, ν) ; 1732 (C=O ester, C=O acide, C=O carbamate, ν).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,37 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,61 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 7,9 Hz, J_{H2-H2'} = 16,1 Hz, H₂) ; 2,75 (dd, 1H, J_{H2'-H3} = 5,7 Hz, J_{H2'-H2} = 16,1 Hz, H_{2'}) ; 3,59 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,29 (m, 1H, H₃) ; 7,1 (d, 1H, J_{NH-H3} = 8,5 Hz, NH) ; 12,7 (se, 1H, H_{acide}).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,8 (C₂) ; 50,0 (CH₃ CO₂Me) ; 51,6 (C₃) ; 78,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 155,1 (C=O Boc) ; 170,7 (C₄) ; 172,6 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹¹⁷

(S)-méthyl 3-(tert-butoxycarbonylamino)-4-oxo-4-(prop-2-ynylamino)butanoate (53)



Une solution d'acide **56** (0,512 g – 2,07 mmol) dans 12,8 mL de THF est traitée à température ambiante par de la *N*-méthylmorpholine (0,252 mL – 2,488 mmol) et de l'isobutylchloroformate (0,339 mL – 2,488 mmol). La propargylamine (0,137 mL – 2,488 mmol) est ajoutée à 0°C et le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 3h. Le précipité formé est filtré et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu est solubilisé dans AcOEt puis lavé par H₂O (3x). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 50:50) pour donner le composé **53** (0,471 g – 1,66 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 80%

CCM : R_f = 0,57 (AcOEt/Cyclohexane 70:30)

PF : 71 – 73°C

$[\alpha]_D^{21} = +18,9$ (c 0,19 – CHCl₃)

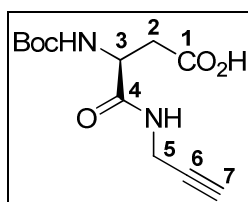
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3330 ; 3385 (N-H, v) ; 3226 (Csp-H, v) ; 2984 ; 2938 (Csp₃-H, v) ; 1736 (C=O ester, v) ; 1686 (C=O carbamate) ; 1655 (C=O amide, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₃H₂₀N₂O₅+Na]⁺ 307,1270 ; trouvé 307,1280 (+3,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,21 (t, 1H, J = 2,8 Hz, H₇) ; 2,67 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 5,5 Hz, J_{H₂-H₂'} = 16,9 Hz, H₂) ; 2,98 (dd, 1H, J_{H₂'-H₃} = 4,5 Hz, J_{H₂'-H₂} = 16,9 Hz, H₂') ; 3,70 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,02 (m, 2H, H₅) ; 4,50 (m, 1H, H₃) ; 5,7 (d, 1H, J_{NH-H₃} = 7,3 Hz, NH) ; 6,83 (m, 1H, J = 2,8 Hz, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 29,2 (C₅) ; 35,7 (C₂) ; 50,5 (CH₃ CO₂Me) ; 52,0 (C₃) ; 71,6 (C₇) ; 79,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 80,6 (C₆) ; 155,5 (C=O Boc) ; 170,4 (C₄) ; 172,2 (C₁).

Acide (S)-3-(tert-butoxycarbonylamino)-4-oxo-4-(prop-2-ynylamino)butanoïque (56)



270,28 g/mol

Une solution d'anhydride **59** (4,61 g – 21,42 mmol) dans 116 mL de dioxane est traitée à température ambiante par de la propargylamine (1,63 mL – 42,84 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans CH₂Cl₂ puis lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5%, par H₂O puis par de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) pour donner l'acide **56** (1,9 g – 7,1 mmol) sous forme d'un solide jaune pâle.

Rendement : 33%

CCM : R_f = 0,61 (AcOEt/MeOH 90:10)

PF : 124 – 127°C

$[\alpha]_D^{21} = +12,5$ (c 1,12 – CHCl₃)

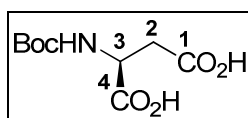
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3343 (N-H, ν) ; 3255 ; 3102 (O-H acide, Csp-H, ν) ; 2987 ; 2926 (Csp₃-H, ν) ; 1719 (C=O acide, ν) ; 1685 (C=O carbamate) ; 1641 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₂H₁₈N₂O₅+Na]⁺ 293,1113 ; trouvé 293,1095 (-6,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,44 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 8,2 Hz, J_{H2-H2'} = 16,3 Hz, H₂) ; 2,57 (dd, 1H, J_{H2'-H3} = 5,3 Hz, J_{H2'-H2} = 16,3 Hz, H_{2'}) ; 3,06 (t, 1H, J = 2,4 Hz, H₇) ; 3,84 (m, 2H, 2H₅) ; 4,23 (m, 1H, H₃) ; 7,00 (d, 1H, J_{NH-H3} = 8,2 Hz, NH) ; 8,23 (t, J = 5,0 Hz, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 28,1 (C₅) ; 36,5 (C₂) ; 50,9 (C₃) ; 72,8 (C₇) ; 78,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 81,0 (C₆) ; 155,1 (C=O Boc) ; 170,8 (C₄) ; 172,0 (C₁).

Acide (L)-N-(*tert*-Butoxycarbonyl)aspartique (**58**)



233,22 g/mol

Une suspension d'acide (*L*)-aspartique (5,0 g – 37,6 mmol) dans 50 mL d'H₂O est traitée par NaOH (4,51 g – 112,7 mmol). Une solution de Boc₂O (9,02 g – 41,3 mmol) dans 50 mL de dioxane est ajoutée à 0°C sur le milieu sur une période de 20 min. Le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 2h puis la nuit à température ambiante. Le dioxane est évaporé sous vide et le résidu aqueux est lavé par Et₂O (3x). La phase aqueuse obtenue est acidifiée par une solution aqueuse saturée en KHSO₄ jusqu'à pH = 1 puis extraite par AcOEt (3x). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut cristallise dans un mélange AcOEt/Cyclohexane pour donner le diacide **58** (6,9 g – 29,7 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 79%

CCM : R_f = 0,27 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 116 – 118°C

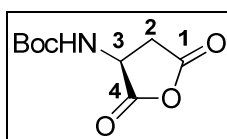
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3357 (N-H, ν) ; 2978 (Csp₃-H, ν ; OH acide, ν) ; 1707 (C=O acide, ν) ; 1692 (C=O carbamate).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,37 (s, 9H, C(CH₃)₃, Boc) ; 2,52 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 7,7 Hz, J_{H₂-H_{2'}} = 16,4 Hz, H₂) ; 2,66 (dd, 1H, J_{H_{2'}-H₃} = 5,6 Hz, J_{H_{2'}-H₂} = 16,4 Hz, H_{2'}) ; 4,25 (m, 1H, H₃) ; 7,00 (d, 1H, J_{NH-H₃} = 8,5 Hz, NH) ; 12,5 (se, 2H, H_{acide}).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 36,1 (C₂) ; 50,1 (C₃) ; 78,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 155,2 (C=O Boc) ; 172,0 (C₄) ; 172,9 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹²⁵

(S)-tert-Butyl 2,5-dioxotetrahydrofuran-3-ylcarbamate (59)



215,2 g/mol

A une solution de diacide **58** (5,0 g – 21,44 mmol) dans 36 mL d'AcOEt est ajouté le DCC (4,42 g – 21,44 mmol) à 0°C par portions. Le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 1h puis à température ambiante pendant 1h supplémentaire. Le milieu est filtré puis concentré sous vide pour donner l'anhydride **59** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,53 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

PF : 120 – 122°C

$[\alpha]_D^{21} = + 5,9$ (c 0,205 – CHCl₃)

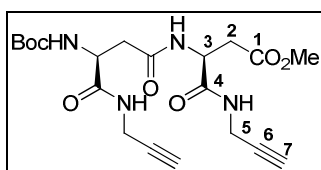
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3383 (N-H, ν) ; 2982 ; 2937 (Csp₃-H, ν) ; 1794 (C=O anhydride, ν) ; 1676 (C=O carbamate).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,83 (dd, 1H, $J_{H_2-H_3} = 6,3$ Hz, $J_{H_2-H_2'} = 18,4$ Hz, H₂) ; 3,22 (dd, 1H, $J_{H_2'-H_3} = 10,1$ Hz, $J_{H_2'-H_2} = 18,4$ Hz, H_{2'}) ; 4,60 (ddd, 1H, $J_{H_3-H_2} = 6,3$ Hz, $J_{H_3-NH} = 7,6$ Hz, $J_{H_3-H_2'} = 10,0$ Hz, H₃) ; 7,73 (d, 1H, $J_{NH-H_3} = 7,7$ Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 27,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 34,2 (C₃) ; 50,1 (C₂) ; 79,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 155,2 (C=O Boc) ; 169,9 (C₄) ; 172,3 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹²⁵

Dimère « propargylamide » (**60**)



436,46 g/mol

Le sel d'acide trifluoroacétique **54** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc en utilisant :

- composé **53** (0.501g – 1.94 mmol)
- TFA/CH₂Cl₂ (1:1 - 5mL)

On obtient le sel correspondant sous forme d'une pâte marron.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,73 (AcOEt/MeOH 50 : 50)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 2,82 (dd, 1H, $J_{H_2-H_3} = 7,4$ Hz, $J_{H_2-H_2'} = 17,1$ Hz, H₂) ; 2,88 (dd, 1H, $J_{H_2'-H_3} = 5,2$ Hz, $J_{H_2'-H_2} = 17,1$ Hz, H_{2'}) ; 3,20 (t, 1H, $J_{H_7-H_5/H_5'} = 2,5$ Hz, H₇) ; 3,64 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,90 (ddd, 1H, $J_{H_5-H_7} = 2,6$ Hz, $J_{H_5-NH'} = 5,2$ Hz, $J_{H_5-H_5'} = 17,6$ Hz, H₅) ; 3,96 (m, 1H, $J = 2,5$ Hz, $J = 5,5$ Hz, $J = 17,6$ Hz, H_{5'}) ; 4,09 (m, 1H, H₃) ; 8,33 (se, 3H, NH₃⁺) ; 8,94 (m, 1H, $J = 5,3$ Hz, NH').

Une solution de sel d'acide trifluoroacétique **54** (0,524 g – 1,759 mmol) dans 20,7 mL de DMF est ajoutée sous atmosphère inerte sur l'acide carboxylique **56** (0,455 g – 1,683 mmol) à température ambiante. Le TBTU (0,675 g – 2,104 mmol) et la triéthylamine (0,469 mL – 3,367 mmol) sont ajoutés et le milieu est maintenu sous agitation pendant 4h30. Le DMF est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) pour donner le dimère **60** (0,272 g – 0,623 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 37%

CCM : R_f = 0,26 (AcOEt/Cyclohexane 75:25)

PF : 167 – 170°C

$[\alpha]_D^{21} = -96,0$ (c 0,025 – DMF)

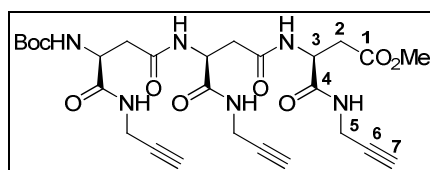
IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3321 ; 3304 ; 3268 ; 3250 (N-H, ν) ; 3072 (Csp-H, ν) ; 2989 (Csp₃-H, ν) ; 1735 (C=O ester, ν) ; 1687 (C=O carbamate) ; 1638 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7+\text{Na}]^+$ 459,1856 ; trouvé 459,1837 (-4,1 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,32 (dd, 1H, $J_{\text{H}2\text{A}-\text{H}3\text{A}} = 8,1$ Hz, $J_{\text{H}2\text{A}-\text{H}2'\text{A}} = 14,5$ Hz, H_{2A}) ; 2,53 (m, 2H, H_{2'A} et H_{2B}) ; 2,71 (dd, 1H, $J_{\text{H}2'\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 6,5$ Hz, $J_{\text{H}2'\text{B}-\text{H}2\text{B}} = 16,2$ Hz, H_{2'B}) ; 3,06 (t, 2H, $J = 2,4$ Hz, H_{7A} H_{7B}) ; 3,58 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,84 (m, 4H, H_{5A}, H_{5B}) ; 4,28 (m, 1H, $J = 7,7$ Hz, $J = 14,2$ Hz, H_{3A}) ; 4,59 (m, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 14,8$ Hz, H_{3B}) ; 6,95 (d, 1H, $J_{\text{NH}-\text{H}3} = 8,4$ Hz, NH_A) ; 8,24 (d, 1H, $J_{\text{NH}B-\text{H}3\text{B}} = 8,2$ Hz, NH_B) ; 8,26 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, NH'_B) ; 8,32 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, NH'_A).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 28,2 (2C₅) ; 35,9 (C_{2B}) ; 37,8 (C_{2A}) ; 49,0 (C_{3B}) ; 51,3 (C_{3A}) ; 51,4 (CH₃ CO₂Me) ; 72,8 (2C₇) ; 78,3 (C(CH₃)₃ Boc) ; 80,8 81,0 (2C₆) ; 155,0 (C=O Boc) ; 169,5 (C_{1A}) ; 169,9 (C_{4A}) ; 170,5 (C_{1B}) ; 171,1(C_{4B}).

Trimère « propargylamide » (62)



C₂₇H₃₆N₆O₉

588,61 g/mol

Le dimère **60** est déprotégé selon la procédure de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc et engagé sans purification. Une solution du sel d'acide trifluoroacétique **61** obtenu (0,240 g – 0,534 mmol) dans 6,8 mL de DMF est ajoutée sous atmosphère inerte sur l'acide carboxylique **56** (0,159 g – 0,587 mmol) à température ambiante. Le TBTU (0,214 g – 0,667 mmol) et la triéthylamine (0,149 mL – 1,067 mmol) sont ajoutés et le milieu est maintenu sous agitation pendant 4h30. Le DMF est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CHCl₃/DMF de 90:10 à 70:30) conditionnée au départ avec CHCl₃ pur et le dépôt étant effectué sous forme d'une solution de produit brut dans un minimum de DMF. On obtient le trimère **62** (0,223 g – 0,379 mmol) contaminé par des sous-produits.

Rendement : 71%

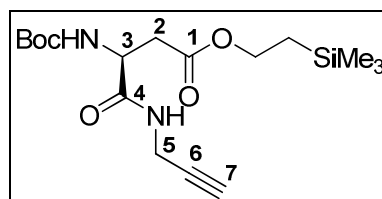
CCM : Rf = 0,19 (CH₂Cl₂/ MeOH 90:10)

HR-MS : m/z calculé pour [C₂₇H₃₆N₆O₉+Na]⁺ 611,2441 ; trouvé 611,2446 (0,7 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,30 (m, 2H, H_{2A}, H₂) ; 2,55 (m, 2H, H_{2'A}, H₂) ; 2,64 (dd, 1H, J = 7,1 Hz, J = 14,6 Hz, H_{2'B}) ; 2,75 (dd, 1H, J = 6,0 Hz, J = 16,0 Hz, H_{2'C}) ; 3,07 (m, 3H, H₇) ; 3,58 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,85 (m, 6H, H₅) ; 4,30 (m, 1H, J = 7,4 Hz, H_{3A}) ; 4,60 (m, 2H, J = 7,3 Hz, J = 13,7 Hz, H_{3B} H_{3C}) ; 7,01 (d, 1H, J_{NH-H3} = 8,2 Hz, NH_A) ; 8,28 (m, 5H, 2NH, 2NH').

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 28,2 (3C₅) ; 30,7 ; 35,7 ; 35,9 (3C₂) ; 49,1 ; 49,7 ; 51,2 (3C₃) ; 51,5 (CH₃ CO₂Me) ; 72,8 (3C₇) ; 78,4 (C(CH₃)₃ Boc) ; 80,8 (3C₆) ; 155,1 (C=O Boc) ; 169,5 ; 170,0 ; 170,6 ; 170,8 ; 170,2 (3C₁, 3C₄).

(S)-3-(tert-Butoxycarbonylamino)-4-oxo-4-(prop-2-ynylamino)butanoate de 2-(triméthylsilyl) éthyle (64)



C₁₇H₃₀N₂O₅Si

370,52 g/mol

Sous atmosphère inerte et à température ambiante, une solution d'acide **56** (0,100 g – 0,370 mmol) dans 4 mL de CH₂Cl₂ anhydre est traitée par de la DMAP (0,004 g – 0,030 mmol) puis par du 2-(triméthylsilyl)-éthanol (0,138 g – 0,962 mmol). Le DCC (0,084 g – 0,407 mmol) est ajouté à 0°C puis le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 5-10 min. puis à température ambiante pendant 4h. Le précipité est ensuite filtré sur célite et le filtrat est concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 30:70) pour donner le composé **64** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 78%

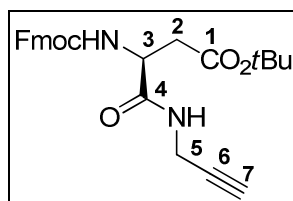
CCM : Rf = 0,48 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3387 3367 3229 (N-H, ν) ; 2982 2955 2918 (Csp₃-H, ν) ; 1734 (C=O ester ; ν) ; 1694 (C=O carbamate) ; 1663 (C=O amide, ν).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0,01 0,02 (s, 9H, OCH₂CH₂Si(CH₃)₃) ; 0,97 (m, 2H, OCH₂CH₂Si(CH₃)₃) ; 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,21 (t, 1H, *J*_{H7-H5} = 2,5 Hz, H₇) ; 2,64 (dd, 1H, *J*_{H2-H3} = 5,9 Hz, *J*_{H2-H2'} = 17,0 Hz, H₂) ; 2,97 (dd, 1H, *J*_{H2'-H3} = 4,4 Hz, *J*_{H2'-H2} = 17,1 Hz, H_{2'}) ; 4,03 (m, 2H, OCH₂CH₂Si(CH₃)₃) ; 4,17 (m, 2H, 2H₅) ; 4,48 (m, 1H, H₃) ; 5,70 (d, 1H, *J*_{NH-H3} = 7,5 Hz, NH) ; 6,79 (m, 1H, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : -1,6 (OCH₂CH₂Si(CH₃)₃) ; 17,2 (OCH₂CH₂Si(CH₃)₃) ; 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 29,3 (C₅) ; 36,0 (C₂) ; 50,5 (C₃) ; 63,4 (OCH₂CH₂Si(CH₃)₃) ; 71,6 (C₇) ; 79,1 (C₆) ; 80,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 155,6 (C=O Boc) ; 170,5 (C₄) ; 172,0 (C₁).

(S)-tert-butyl-3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-4-oxo-4-(prop-2-ynylamino) butanoate (67)



C₂₆H₂₈N₂O₅

448, 51 g/mol

Le composé **67** est obtenu en appliquant la procédure générale de couplage peptidique 2 en utilisant :

- Fmoc-Asp(OtBu)-OH (4,0 g – 9,72 mmol)
- propargylamine (0,443 mL – 11,67 mmol)
- HOBT.H₂O (1,57 g – 11,67 mmol)
- EDCi.HCl (2,23 g – 11,67 mmol)
- CH₂Cl₂ (48,6 mL)

Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12h. Le milieu est dilué dans CH₂Cl₂ et lavé successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 5%, avec H₂O, avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ et finalement avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane 30:70) pour donner le composé attendu sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 80%

CCM : R_f = 0,43 (AcOEt/Cyclohexane 60:40)

PF : 104 – 106°C

$[\alpha]_D^{21} = + 20,1$ (c 1,0 – CHCl₃; lit. + 16,9)

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3290 (N-H, ν) ; 3064 ; 3043 ; 3009 (Csp₂-H, ν) ; 2978 ; 2935 (Csp₃-H, ν) ; 2122 (C≡C, ν) ; 1728 (C=O ester ; ν) ; 1694 (C=O carbamate) ; 1655 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₂₆H₂₈N₂O₅+H]⁺ 449,2076 ; trouvé 449,2078 (0,3 ppm).

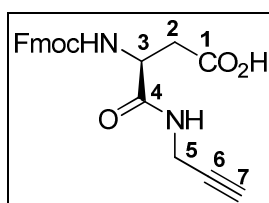
HPLC : t_R = 45,59 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 2,20 (t, 1H, J = 2,5 Hz, H₇) ; 2,62 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 6,4 Hz, J_{H₂-H_{2'}} = 16,9 Hz, H₂) ; 2,90 (dd, 1H, J_{H_{2'}-H₃} = 3,7 Hz, J_{H_{2'}-H₂} = 16,9 Hz, H_{2'}) ; 4,03 (m, 2H, 2H₅) ; 4,21 (t, 1H, J = 6,8 Hz, CH Fmoc) ; 4,45 (m, 2H, CH₂ Fmoc) ; 4,53 (m, 1H, H₃) ; 5,98 (d, 1H, J_{NH-H₃} = 8,0 Hz, NH) ; 6,74 (se, 1H, NH⁺) ; 7,31 (t, 2H, J = 7,4 Hz, 2H_{Ar}) ; 7,40 (t, 2H, J = 7,4 Hz, 2H_{Ar}) ; 7,56 (t, 2H, J = 6,7 Hz, 2H_{Ar}) ; 7,76 (d, 2H, J = 7,5 Hz, 2H_{Ar}Fmoc).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,4 (C₅) ; 37,4 (C₂) ; 47,2 (CH Fmoc) ; 51,1 (C₃) ; 67,2 (CH₂ Fmoc) ; 71,8 (C₇) ; 79,1 (C₆) ; 82,0 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 120,1 ; 125,0 ; 127,1 ; 127,8 (CH_{Ar} Fmoc) ; 156,1 (C=O, Fmoc) ; 170,2 (C₁) ; 171,0 (C₄).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹³⁵

Acide (S)-3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-4-oxo-4-(prop-2-ynylamino)butanoïque (68)



C₂₂H₂₀N₂O₅

392, 40 g/mol

Le composé **68** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'acide protégé sous forme de CO₂tBu en utilisant :

- Ester **67** (2,0 g – 4,46 mmol)
- TFA (6 mL)

- CH₂Cl₂ (5 mL)

On obtient le composé attendu sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,38 (CH₂Cl₂/ MeOH 90:10)

PF : 150 – 152°C

$[\alpha]_D^{21} = -16,2$ (c 0,32 – MeOH)

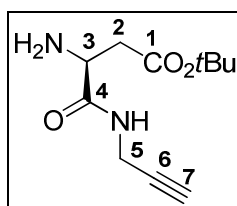
IR (pur) v (cm⁻¹) : 3368 ; 3294 (N-H, O-H, v) ; 3066 ; 3001 (Csp₂-H, v) ; 2978 ; 2931 ; 2877 (Csp₃-H, v) ; 1722 (C=O acide, v) ; 1660 (C=O, carbamate, amide, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₂₂H₂₀N₂O₅+H]⁺ 393,1450 ; trouvé 393,1465 (3,7 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm) : 2,63 (t, 1H, J = 2,6 Hz, H₇) ; 2,77 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 7,1 Hz, J_{H₂-H_{2'}} = 16,7 Hz, H₂) ; 2,90 (dd, 1H, J_{H_{2'}-H₃} = 5,8 Hz, J_{H_{2'}-H₂} = 16,7 Hz, H_{2'}) ; 4,00 (d, 2H, J = 2,3 Hz, H₅) ; 4,24 (t, 1H, J = 7,1 Hz, 1H, CH Fmoc) ; 4,31 (dd, 2H, J = 7,1 Hz, J = 10,3 Hz, CH₂ Fmoc) ; 4,39 (dd, 1H, J = 7,1 Hz, J = 10,3 Hz, CH₂ Fmoc) ; 4,58 (t, 1H, J = 6,0 Hz, H₃) ; 7,32 (m, 2H, 2H_{Ar}) ; 7,41 (t, 2H, J = 7,5 Hz, 2H_{Ar}) ; 7,70 (d, 2H, J = 7,5 Hz, 2H_{Ar}) ; 7,86 (d, 2H, J = 7,5 Hz, H_{Ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm) : 30,1 (C₅) ; 37,5 (C₂) ; 48,9 (CH Fmoc) ; 53,3 (C₃) ; 68,4 (CH₂ Fmoc) ; 73,1 (C₇) ; 80,0 (C₆) ; 121,8 ; 127,2 ; 128,9 ; 129,5 (CHAr Fmoc) ; 157,9 (C=O, Fmoc) ; 171,1 (C₄) ; 173,3 (C₁).

(S)-tert-butyl 3-amino-4-oxo-4-(prop-2-ynylamino)butanoate (69)



C₁₁H₁₈N₂O₃

226, 27 g/mol

L'amine **69** est obtenue en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- Composé **67** (2,0 g – 4,46 mmol)
- DMF/ Pipéridine (8 : 2 – 100 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 93:7) pour donner 1,01 g (4,46 mmol) d'amine libre **69** sous forme d'une huile jaune.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,43 (CH₂Cl₂/ MeOH 90:10)

$[\alpha]_D^{21} = -12,2$ (c 0,5 – CHCl₃)

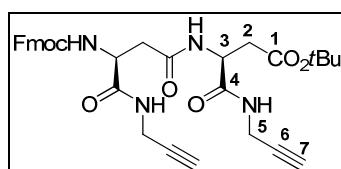
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3367 ; 3295 (N-H, ν) ; 3066 ; 3001 (C_{sp2}-H, ν) ; 2978 ; 2932 ; 2878 (C_{sp3}-H, ν) ; 2120 (C≡C, ν) ; 1722 (C=O ester ; ν) ; 1660 (C=O carbamate, C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₁H₁₈N₂O₃+H]⁺ 227,1396 ; trouvé 227,1409 (5,9 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,75 (s, 2H, NH₂) ; 2,19 (t, 1H, J = 2,3 Hz, H₇) ; 2,50 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 8,2 Hz, J_{H₂-H₂'} = 16,6 Hz, H₂) ; 2,78 (dd, 1H, J_{H₂'-H₃} = 3,9 Hz, J_{H₂'-H₂} = 16,6 Hz, H₂') ; 3,62 (dd, 1H, J_{H₃-H₂'} = 3,9 Hz, J_{H₃-H₂} = 8,2 Hz, H₃) ; 3,97 (m, 1H, J = 2,3 Hz, J = 5,4 Hz, J = 17,6 Hz, H₅) ; 4,03 (m, 1H, J = 2,3 Hz, J = 5,5 Hz, J = 17,6 Hz, H₅') ; 7,62 (m, 1H, NH')

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,0 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 28,9 (C₅) ; 40,4 (C₂) ; 51,9 (C₃) ; 71,3 (C₇) ; 79,5 (C₆) ; 81,2 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 171,0 (C₄) ; 173,2 (C₁).

Dimère « propargylamide » (**70**)



C₃₃H₃₆N₄O₇

600, 66 g/mol

Le dimère **70** est obtenu en appliquant la *procédure générale 2* de couplage peptidique en utilisant :

- Amine **69** (0,105 g – 0,464 mmol)
- Acide carboxylique **68** (0,200 g – 0,510 mmol)
- HOBt.H₂O (0,075 g – 0,557 mmol)
- EDCi.HCl (0,106 g – 0,557 mmol)
- CH₂Cl₂ (2,3 mL + 5 mL pour bonne agitation du milieu)

Après 8h de réaction à température ambiante, les solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4 successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturé en NaHCO₃ (4x) et de nouveau par H₂O (4x). Le produit obtenu est séché sous vide pour donner le dimère **70** sous la forme d'un solide blanc.

Rendement : 82%

CCM : Rf = 0,20 (AcOEt/Cyclohexane 60:40)

$[\alpha]_D^{21} = -25,0$ (c 0,52 – DMF)

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3289 (N-H, ν) ; 3066 (Csp₂-H, ν) ; 2978 ; 2933 (Csp₃-H, ν) ; 1730 (C=O ester ; ν) ; 1687 (C=O carbamate) ; 1649 (C=O amide, ν).

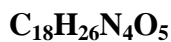
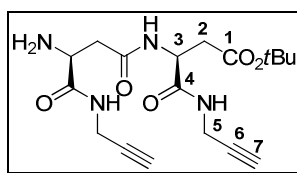
HR-MS : m/z calculé pour [C₃₃H₃₆N₄O₇+H]⁺ 601,2662 ; trouvé 601,2659 (-0,5 ppm).

HPLC : t_R = 25,11 min (H₂O/MeCN 50:50)

RMN ¹H (400 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 2,92 (dd, 1H, $J_{H2B-H3B} = 8,0$ Hz, $J_{H2B-H2'B} = 15,7$ Hz, H_{2B}) ; 3,04 (m, 3H, 2H₇, H_{2A}) ; 3,28 (m, 2H, $J = 6,3$ Hz, $J = 15,7$ Hz, H_{2'A}, H_{2'B}) ; 4,18 (t, 1H, $J = 6,7$ Hz, CH Fmoc) ; 4,34 (m, 5H, 4H₅, CH₂ Fmoc) ; 4,56 (m, 1H, CH₂ Fmoc) ; 5,48 (m, 1H, $J_{H3A-NHA} = 8,4$ Hz, $J_{H3A-H2A} = 5,8$ Hz, H_{3A}) ; 5,56 (m, 1H, H_{3B}) ; 7,25 (m, 2H, 2H_{Ar}) ; 7,41 (m, 2H, 2H_{Ar}) ; 7,60 (m, 2H, 2H_{Ar}) ; 7,84 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, 2H_{Ar} Fmoc) ; 9,21 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,4$ Hz, NH_A) ; 9,25 (m, 1H, NH'_A) ; 9,74 (m, 1H, NH'_B) ; 9,78 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 8,5$ Hz, NH_B).

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 28,3 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,6 ; 29,7 (2C₅) ; 38,7 (C_{2B}) ; 39,6 (C_{2A}) ; 47,9 (CH Fmoc) ; 51,1 (C_{3B}) ; 53,4 (C_{3A}) ; 67,1 (CH₂ Fmoc) ; 72,5 ; 72,6 (2C₇) ; 81,0 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 81,6 ; 81,7 (2C₆) ; 120,7 ; 125,9 ; 126,0 ; 127,8 ; 128,4 (CH_{Ar} Fmoc) ; 141,9 ; 144,8 (C_{Ar} Fmoc) ; 157,4 (C=O Fmoc) ; 170,7 (C_{1B}) ; 171,2 (C_{1A}) ; 171,6 (C_{4A}) ; 172,7 (C_{4B}).

Dimère amine « propargylamide » (71)



378,42 g/mol

Le composé **71** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- Dimère **70** (0,376 g – 0,626 mmol)
- CH₃CN/Et₂NH (23,2 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) pour donner l'amine libre sous forme d'une huile incolore.

Rendement : quantitatif.

CCM : R_f = 0,58 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

$[\alpha]_D^{21} = -36,1$ (c 0,28 – DMF)

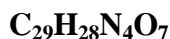
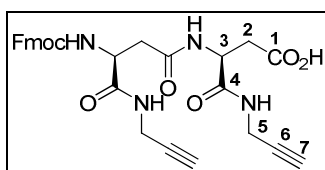
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3279 (N-H, ν) ; 3074 (Csp²-H, ν) ; 2980 ; 2929 (Csp³-H, ν) ; 2119 (C≡C, ν) ; 1726 (C=O ester, ν) ; 1634 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₈H₂₆N₄O₅+H]⁺ 379,1981 ; trouvé 379,1986 (1,2 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,94 (se, 2H, NH_A) ; 2,20 (m, 1H, H_{7A}) ; 2,23 (m, 1H, H_{7B}) ; 2,52 (dd, 1H, $J_{H_{2A}-H_{3A}} = 6,3$ Hz, $J_{H_{2A}-H_{2'A}} = 14,2$ Hz, H_{2A}) ; 2,61 (dd, 1H, $J_{H_{2'A}-H_{3A}} = 6,3$ Hz, $J_{H_{2'A}-H_{2A}} = 14,2$ Hz, H_{2'A}) ; 2,62 (dd, 1H, $J_{H_{2'B}-H_{3B}} = 5,8$ Hz, $J_{H_{2'B}-H_{2B}} = 16,8$ Hz, H_{2'B}) ; 2,89 (ddd, 1H, $J_{H_{2B}-H_{3B}} = 5,2$ Hz, $J_{H_{2B}-H_{2B}} = 16,8$ Hz, H_{2B}) ; 3,80 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz, H_{3A}) ; 4,00 (m, 4H, 4H₅) ; 4,78 (m, 1H, H_{3B}) ; 7,33 (d, 1H, $J_{NH_B-H_{3B}} = 8,7$ Hz, NH_B) ; 7,71 (t, 1H, $J_{NH'B-H_{5B}} = 5,1$ Hz, NH'_B) ; 7,56 (t, 1H, $J_{NH'A-H_{5A}} = 5,2$ Hz, NH'_A).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,0 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 28,9 (C_{5A}) ; 29,2 (C_{5B}) ; 36,8 (C_{2B}) ; 41,5 (C_{2A}) ; 49,4 (C_{3B}) ; 52,3 (C_{3A}) ; 71,2 (C_{7A}) ; 71,5 (C_{7B}) ; 79,4 (C_{6B}) ; 79,5 (C_{6A}) ; 170,3 (C_{4B}) ; 170,9 (2C₁) ; 173,6 (2C_{4A}).

Dimère acide « propargylamide » (72)



544,56 g/mol

Le composé **72** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'acide protégé sous forme de CO_2tBu en utilisant :

- Dimère **70** (0,100 g – 0,166 mmol)
- CH_2Cl_2 (1,5 mL)
- TFA (3 mL)

Le produit brut obtenu est ensuite lavé par du CH_2Cl_2 pour donner un solide blanc.

Rendement : quantitatif.

CCM : $R_f = 0,60$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 80:20)

$[\alpha]_D^{21} = -28,3$ (c 0,24 – DMF)

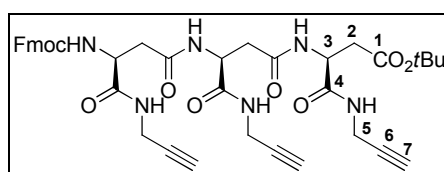
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3287 ; 3223 (N-H, ν) ; 3066 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2881 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1697 (C=O acide, C=O carbamate, ν) ; 1641 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7+\text{H}]^+$ 545,2036 ; trouvé 545,2034 (-0,4 ppm).

RMN ^1H (400 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm) : 3,01 (m, 2H, 2H_7) ; 3,05 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2\text{A}}-\text{H}_{3\text{A}}} = 5,9$ Hz, $J_{\text{H}_{2\text{A}}-\text{H}_{2'\text{A}}} = 14,4$ Hz, $\text{H}_{2\text{A}}$) ; 3,25 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2\text{B}}-\text{H}_{3\text{B}}} = 7,1$ Hz, $J_{\text{H}_{2\text{B}}-\text{H}_{2'\text{B}}} = 16,4$ Hz, $\text{H}_{2\text{B}}$) ; 3,31 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2'\text{A}}-\text{H}_{3\text{A}}} = 8,5$ Hz, $J_{\text{H}_{2'\text{A}}-\text{H}_{2\text{A}}} = 14,4$ Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$) ; 3,45 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2'\text{B}}-\text{H}_{3\text{B}}} = 5,7$ Hz, $J_{\text{H}_{2'\text{B}}-\text{H}_{2\text{B}}} = 16,4$ Hz, $\text{H}_{2'\text{B}}$) ; 4,17 (t, 1H, $J = 6,7$ Hz, CH Fmoc) ; 4,35 (m, 5H, 4H_5 , CH_2 Fmoc) ; 4,55 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J = 9,6$ Hz, CH_2 Fmoc) ; 5,50 (m, 1H, $J_{\text{H}_{3\text{A}}-\text{H}_{2\text{A}}} = 5,9$ Hz, $J_{\text{H}_{3\text{A}}-\text{N}_{\text{H}_\text{A}}} = 7,6$ Hz, $\text{H}_{3\text{A}}$) ; 5,70 (m, 1H, $J_{\text{H}_{3\text{B}}-\text{N}_{\text{H}_\text{B}}} = 6,7$ Hz, $\text{H}_{3\text{B}}$) ; 7,25 ; 7,40 ; 7,60 ; 7,83 (m, 8H, H_{Ar} Fmoc) ; 9,24 (m, 2H, NH_A , $1\text{NH}'$) ; 9,72 (m, 2H, NH_B , $1\text{NH}'$) ; 11,10 (se, 1H, H_{acide}).

RMN ^{13}C (100 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm) : 29,9 ; 30,0 (2C_5) ; 37,9 ($\text{C}_{2\text{B}}$) ; 40,0 ($\text{C}_{2\text{A}}$) ; 48,1 (CH Fmoc) ; 51,5 ($\text{C}_{3\text{B}}$) ; 53,8 ($\text{C}_{3\text{A}}$) ; 67,4 (CH_2 Fmoc) ; 72,7 ; 72,9 (2C_7) ; 81,9 ; 83,0 (2C_6) ; 120,9 ; 126,2 ; 126,3 ; 128,0 ; 128,6 (CH_{Ar} Fmoc) ; 142,2 ; 145,1 (C_{Ar} Fmoc) ; 157,7 (C=O Fmoc) ; 171,7 ($\text{C}_{1\text{A}}$) ; 172,3 ($\text{C}_{1\text{B}}$) ; 173,0 ($\text{C}_{4\text{A}}$) ; 174,4 ($\text{C}_{4\text{B}}$).

Trimère « propargylamide » (73)



752,81 g/mol

Le composé **73** est obtenu en appliquant la *procédure générale 2* de couplage peptidique en utilisant :

- Amine **71** (0,083 g – 0,219 mmol)
- Acide carboxylique **68** (0,086 g – 0,219 mmol)
- HOBt.H₂O (0,036 g – 0,263 mmol)
- EDCi.HCl (0,050 g – 0,263 mmol)
- DMF (3 mL).

Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4 successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturée en de NaHCO₃ (4x), de nouveau par H₂O (4x) et enfin par du méthanol (3x). Le produit obtenu est séché sous vide pour donner 0,143 g (0,190 mmol) de trimère **73** sous la forme d'un solide blanc cassé.

Rendement : 87%

CCM : R_f = 0,43 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 207 – 212°C

$[\alpha]_D^{21} = -29,2$ (c 0,25 – DMF)

IR (pur) v (cm⁻¹) : 3283 (N-H, v) ; 3075 ; 3053 (Csp²-H, v) ; 2978 ; 2947 (Csp³-H, v) ; 1724 (C=O ester ; v) ; 1695 (C=O carbamate) ; 1641 (C=O amide, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₄₀H₄₄N₆O₉+H]⁺ 753,3248 ; trouvé 753,3257 (1,2 ppm).

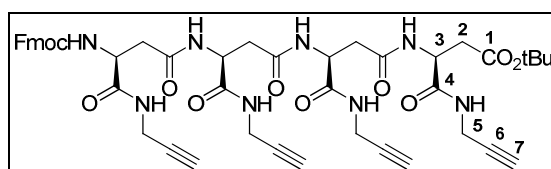
HPLC : t_R = 18,44 min (H₂O/MeCN 50:50)

RMN ¹H (500 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 2,90 (dd, 1H, J_{H2C-H3C} = 8,1 Hz, J_{H2C-H2'C} = 15,7 Hz, H₂C) ; 3,00 (m, 5H, H_{2A}, H_{2B}, 3H₇) ; 3,18 (dd, 1H, J_{H2'A-H3A} = 8,4 Hz, J_{H2'A-H2A} = 14,2 Hz, H_{2'A}) ; 3,22 (dd, 1H, J_{H2'B-H3B} = 8,3 Hz, J_{H2'B-H2B} = 14,2 Hz, H_{2'B}) ; 3,28 (dd, 1H, J_{H2'C-H3C} = 5,9 Hz, J_{H2'C-H2C} = 15,7 Hz, H_{2'C}) ; 4,17 (t, 1H, J = 7,0 Hz,

CH Fmoc) ; 4,31 (m, 7H, 6H₅, CH₂ Fmoc) ; 4,55 (dd, 1H, $J = 7,0$ Hz, $J_{CH_2-CH_2} = 10,4$ Hz, CH₂ Fmoc) ; 5,43 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,57 (m, 1H, H_{3C}) ; 5,77 (m, 1H, H_{3B}) ; 7,25 7,40 7,59 7,84 (8H, H_{Ar} Fmoc) ; 9,18 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,6$ Hz, NH_A) ; 9,24 (m, 2H, 2NH') ; 9,77 (m, 1H, NH' C) ; 9,78 (d, 1H, $J_{NHC-H3C} = 8,6$ Hz, NH_C) ; 9,84 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 8,6$ Hz, NH_B).

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 28,4 (C(CH₃)₃, CO₂tBu) ; 29,7 ; 29,8 (3C₅) ; 38,9 (C_{2C}) ; 39,4 (C_{2B}) ; 39,8 (C_{2A}) ; 48,0 (CH Fmoc) ; 51,3 (C_{3C}) ; 51,6 (C_{3B}) ; 53,6 (C_{3A}) ; 67,2 (CH₂ Fmoc) ; 72,6 ; 72,7 ; 72,8 (3C_{7A}) ; 81,4 (C(CH₃)₃, CO₂tBu) ; 81,7 ; 81,8 ; 82,0 (3C₆) ; 120,9 126,2 ; 127,9 ; 128,5 (CH_{Ar} Fmoc) ; 142,1 ; 144,9 (C_{Ar} Fmoc) ; 157,6 (C=O Fmoc) ; 170,9 (C_{1C}) ; 171,4 (C_{1B}) ; 171,8 (C_{1A}-C_{4A}) ; 172,7 (C_{4B}) ; 172,9 (C_{4C}).

Tétramère « propargylamide » (74)



C₄₇H₅₂N₈O₁₁

904,96 g/mol

Le tétramère **74** est obtenu en appliquant la *procédure générale 2* de couplage peptidique en utilisant :

- Amine **71** (0,190 g – 0,502 mmol)
- Acide carboxylique **72** (0,417 g – 0,766 mmol)
- HOBt.H₂O (0,081 g – 0,603 mmol)
- EDCi.HCl (0,06 g – 0,753 mmol)
- DMF (6,3 mL).

Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4 successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (4x) et de nouveau par H₂O (4x) et enfin par du méthanol (3x) et de l'éther éthylique (2x). Le produit obtenu est séché sous vide pour donner 0,331 g (0,366 mmol) de tétramère **74** sous la forme d'un solide blanc.

Rendement : 73%

CCM : Rf = 0,88 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

PF : 252 – 257°C

$[\alpha]_D^{21} = -35,2$ (c 0,145 – DMF)

IR (pur) v (cm⁻¹) : 3279 (N-H, v) ; 3059 (Csp₂-H, v) ; 2947 (Csp₃-H, v) ; 1721 (C=O ester ; v) ; 1694 (C=O carbamate) ; 1643 (C=O amide, v).

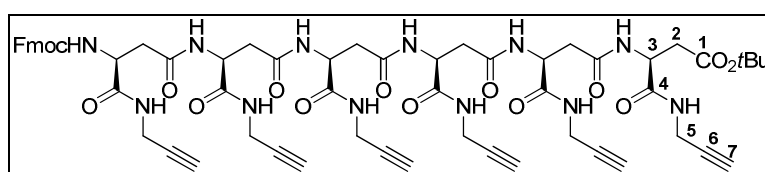
HR-MS : m/z calculé pour [C₄₇H₅₃N₈O₁₁+H]⁺ 905,3834 ; trouvé 905,3829 (-0,5 ppm).

HPLC : t_R = 28,18 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (500 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 2,89 (dd, 1H, J_{H2D-H3D} = 8,2 Hz, J_{H2D-H2'D} = 15,7 Hz, H_{2D}) ; 3,00 (m, 7H, H_{2A}, H_{2B}, H_{2C}, 4H₇) ; 3,16 (m, 3H, H_{2'A}, H_{2'B}, H_{2'C}) ; 3,28 (dd, 1H, J_{H2'D-H3D} = 5,8 Hz, J_{H2'D-H2D} = 15,7 Hz, H_{2'D}) ; 4,31 (m, 10H, 8H₅, CH Fmoc CH₂ Fmoc) ; 4,55 (m, 1H, CH₂ Fmoc) ; 5,41 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,55 (m, 1H, H_{3D}) ; 5,71 (m, 1H, 1H₃) ; 5,75 (m, 1H, 1H₃) ; 7,29 7,39 7,64 7,85 (8H_{Ar} Fmoc) ; 9,17 (d, 1H, J_{NHA-H4A} = 8,4 Hz, NH_A) ; 9,24 (m, 3H, 3NH') ; 9,77 (m, 4H, NH_B, NH_C, NH_D, 1NH').

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 28,5 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,8 ; 29,9 (4C₅) ; 38,9 (C_{2D}) ; 39,4 ; 39,5 ; 39,8 (3C₂) ; 48,1 (CH Fmoc) ; 51,3 ; 51,6 ; 51,7 (3C₃) ; 53,7 (C_{3A}) ; 67,4 (CH₂ Fmoc) ; 72,7 ; 72,8 ; 72,9 (4C₇) ; 81,3 ; 81,7 ; 81,9 (4C₆) ; 102,9 ; 126,2 ; 126,2 ; 128,0 ; 128,2 ; 128,6 ; 129,9 (CH_{Ar} Fmoc) ; 136,5 ; 142,1 ; 145,0 (C_{Ar} Fmoc) ; 157,7 (C=O Fmoc) ; 171,0 ; 171,7 ; 171,9 ; 172,6 ; 172,7 ; 172,9 (4C₁, 4C₄).

Hexamère « propargylamide » (76)



C₆₁H₆₈N₁₂O₁₅

1209,26 g/mol

L'hexamère **76** est déprotégé en appliquant la procédure générale déprotection d'acide protégé sous forme de CO₂tBu en utilisant :

- Tétramère **74** (0,197 g – 0,218 mmol)
- CH₂Cl₂/TFA (3 mL + 8 mL)

Le produit brut obtenu est ensuite lavé par du CH₂Cl₂ pour donner quantitativement l'acide correspondant **75** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,38 (CH₂Cl₂/MeOH 90: 10)

HR-MS : m/z calculé pour [C₄₃H₄₄N₈O₁₁+H]⁺ 849,3208 ; trouvé 849,3206 (-0,2 ppm).

Le composé **76** est obtenu en appliquant la procédure générale de couplage peptidique 2 en utilisant :

- Amine **71** (0,062 g – 0,164 mmol)
- Acide carboxylique **75** (0,139 g – 0,164 mmol)
- HOBt.H₂O (0,027 g – 0,197 mmol)
- EDCi.HCl (0,038 g – 0,197 mmol)
- DMF (4,2 mL).

Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4 successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (4x), de nouveau par H₂O (4x) puis avec du méthanol (3x) et de l'éther (2x). Le produit obtenu est séché sous vide pour donner 0,137 g (0,133 mmol) d'hexamère **76** sous la forme d'un solide blanc.

Rendement : 69 %

CCM : Rf = 0,38 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : > 300 °C

$[\alpha]_D^{21}$: *Composé insoluble même à très faible concentration dans DMSO, DMF*

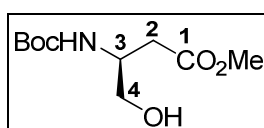
IR (pur) v (cm⁻¹) : 3283 (N-H, v) ; 3074 (Csp₂-H, v) ; 2945 (Csp₃-H, v) ; 1719 (C=O ester ; v) ; 1637 (C=O carbamate, amide, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₆₁H₆₈N₁₂O₁₅+H]⁺ 1209,5005 ; trouvé 1209,5011 (0,6 ppm).

RMN ¹H : *Spectre de mauvaise qualité (composé insoluble dans Pyridine-d₅, DMSO-d₆)*

RMN ¹³C : *Spectre de mauvaise qualité (composé insoluble dans Pyridine-d₅, DMSO-d₆)*

(S)-3-(tert-butoxycarbonylamino)-4-hydroxybutanoate de méthyle (77)



233, 26 g/mol

Sous atmosphère inerte, le *N*-hydroxysuccinimide (2,47 g – 21,43 mmol) est ajouté à 0°C à une solution de **52** (5,0 g – 20,22 mmol) dans AcOEt (40 mL). Après solubilisation totale, une solution de DCC (4,21 g – 20,42 mmol) dans 20 mL d'AcOEt est ajoutée goutte à goutte à 0°C. Le milieu est maintenu sous agitation pendant la nuit. La dicyclohexylurée est filtrée et le filtrat est lavé successivement par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ puis par de la saumure. La phase organique lavée est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide pour donner l'ester activé sous forme d'un solide blanc. Ce dernier est solubilisé dans 13,3 mL de THF puis ajouté goutte à goutte à 0°C à une solution de NaBH₄ (1,21 g – 31,99 mmol) dans un mélange H₂O/THF (7,8 mL/60 mL). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 5 min. jusqu'à disparition totale de l'ester activé sur CCM. La réaction est neutralisée par ajout de NH₄Cl sous forme solide. Le milieu est extrait par AcOEt (3x). Les phases organiques réunies sont lavées par de la saumure, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 40:60) pour donner l'alcool **77** (3,2 g – 13,7 mmol) sous forme d'une huile incolore.

Rendement : 68%

CCM : R_f = 0,53 (AcOEt/Cyclohexane 70:30)

[α]_D²³ = + 5,9 (c 0,5 – CHCl₃)

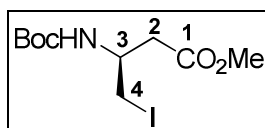
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3374 (N-H, O-H ν) ; 2978 ; 2953 (Csp₃-H, ν) ; 1736 (C=O ester) ; 1691 (C=O carbamate).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,54 (d, 2H, *J* = 6,2 Hz, 2H₂) ; 3,58 (m, 2H, 2H₄) ; 3,60 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,92 (m, 1H, H₃) ; 5,36 (d, 1H, *J*_{NH-H3} = 8,2 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,7 (C₂) ; 49,2 (C₃) ; 51,6 (CH₃ CO₂Me) ; 63,8 (C₄) ; 79,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 155,7 (C=O Boc) ; 172,1 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹³⁷

(S)-3-(tert-butoxycarbonylamino)-4-iodobutanoate de méthyle (84)



C₁₀H₁₈INO₄

343, 16 g/mol

Sous atmosphère inerte, le diiode (12,2 g – 48,23 mmol) est ajouté en trois portions à 0°C en 30 min à une suspension d'imidazole (4,37 g – 64,31 mmol) et de PPh₃ (12,7 g – 48,23 mmol) dans 97 mL d'un mélange Et₂O/CH₂Cl₂ (2:1). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 10 min, puis une solution d'alcool **77** (7,5 g – 32,15 mmol) dans 52 mL de Et₂O/CH₂Cl₂ (2:1) est ajoutée. L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 22h puis les solides sont filtrés et lavés par de l'Et₂O. Le filtrat est concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, de 10:90 à 20:80) pour donner le composé iodé **84** (8,3 g – 24,1 mmol) sous forme d'aiguilles blanches.

Rendement : 75%

CCM : R_f = 0,60 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

PF : 60 – 62°C

$[\alpha]_D^{23} = +9,2$ (c 2,1 – CH₂Cl₂)

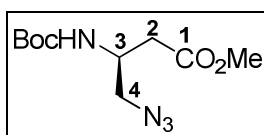
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3344 (N-H, ν) ; 2979 ; 2951 (Csp₃-H, ν) ; 1733 (C=O ester) ; 1684 (C=O carbamate).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,62 (dd, 1H, $J_{H_2-H_3} = 6,1$ Hz, $J_{H_2-H_2'} = 16,2$ Hz, H₂) ; 2,73 (dd, 1H, $J_{H_2'-H_3} = 5,3$ Hz, $J_{H_2'-H_2} = 16,2$ Hz, H_{2'}) ; 3,41 (m, 2H, 2H₄) ; 3,69 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,90 (m, 1H, H₃) ; 5,08 (d, 1H, $J_{NH-H_3} = 6,6$ Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 11,0 (C₄) ; 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 38,4 (C₂) ; 47,6 (C₃) ; 51,9 (CH₃ CO₂Me) ; 79,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 154,6 (C=O Boc) ; 171,1 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁴³

(S)-4-azido-3-(tert-butoxycarbonylamino)butanoate de méthyle (85)



258, 27 g/mol

Un mélange de **84** (8,23 g – 24,0 mmol) et de NaN₃ (9,35 g – 144 mmol) dans 600 mL de DMF est chauffé à 60°C pendant 1h15. Le DMF est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans du CH₂Cl₂ et lavé par une solution aqueuse de Na₂SO₃ 10% puis par de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide pour donner 6,2 g (24 mmol) d'azoture **85** (6,2 g – 24,0 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,53 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3341 (N-H, v) ; 2994 ; 2978 (Csp³-H, v) ; 2096 (N=N=N, v) ; 1731 (C=O ester) ; 1679 (C=O carbamate).

$[\alpha]_D^{23} = -18,0$ (c 0,5 – CHCl₃)

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₀H₁₈N₄O₄+Na]⁺ 281,1226 ; trouvé 281,1238 (4,4 ppm).

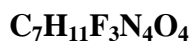
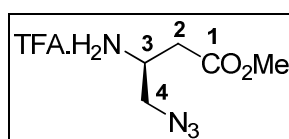
HPLC : t_R = 11,68 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,54 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 6,3 Hz, J_{H₂-H₂'} = 17,0 Hz, H₂) ; 2,60 (dd, 1H, J_{H₂'-H₃} = 5,6 Hz, J_{H₂'-H₂} = 17,0 Hz, H₂') ; 3,43 (dd, 1H, J_{H₄-H₃} = 5,6 Hz, J_{H₄-H₄'} = 12,2 Hz, H₄) ; 3,51 (dd, 1H, J_{H₄'-H₃} = 5,0 Hz, J_{H₄'-H₄} = 12,2 Hz, H₄') ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,07 (m, 1H, H₃) ; 5,13 (d, 1H, J_{NH-H₃} = 6,0 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,9 (C₂) ; 47,0 (C₃) ; 51,7 (CH₃ CO₂Me) ; 53,5 (C₄) ; 79,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 154,8 (C=O Boc) ; 171,3 (C₁).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹³⁸

Trifluoroacétate de (1-azidométhyl-1-méthoxycarbonylméthyl)méthylammonium (86)



272, 18 g/mol

Le sel d'acide trifluoroacétique **86** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc en utilisant :

- Ester **85** (0,501 g – 1,94 mmol)
- TFA/CH₂Cl₂ (6mL)

On obtient le sel correspondant (0,528 g – 1,94 mmol) sous forme d'une huile incolore.

Rendement : quantitatif.

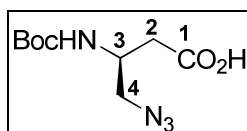
$[\alpha]_D^{21} = -5,66$ (c 0,530 – CHCl₃) amine libre

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₀H₁₈N₄O₄+H]⁺ 159,0882 ; trouvé 159,0873 (- 5,7 ppm),

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,74 (d, 1H, $J_{H_2-H_3} = 4,4\text{Hz}$, $J_{H_2-H_2'} = 17,0\text{ Hz}$, H₂) ; 2,84 (dd, 1H, $J_{H_2'-H_3} = 3,8\text{ Hz}$, $J_{H_2'-H_2} = 17,1\text{ Hz}$, H_{2'}) ; 3,71 (m, 6H, H₃, 2H₄, CH₃ CO₂Me) ; 8,29 (se, 3H, NH₂.TFA).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 33,6 (C₂) ; 47,7 (C₃) ; 51,4 (C₄) ; 52,4 (CH₃ CO₂Me) ; 170,9 (C₁).

Acide (S)-4-azido-3-(tert-butoxycarbonylamino)butanoïque (87)



244, 25 g/mol

L'acide **87** est obtenu en appliquant la procédure générale de saponification d'un ester méthylique en utilisant :

- Ester **85** (2,0 g – 7,74 mmol)
- LiOH.H₂O (0,974 g – 23,23 mmol)
- THF/MeOH/H₂O (232 mL)

On obtient 1,78 g (7,29 mmol) d'acide **87** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 94%.

CCM : R_f = 0,22 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 59 – 62 °C

$[\alpha]_D^{21} = -31,88$ (c 0,505 – MeOH)

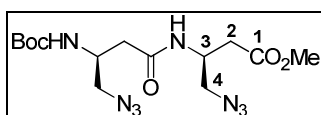
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3414 ; 3368 (N-H, ν) ; 3036 ; 3003 (O-H acide, ν) ; 2985 ; 2935 (C_{sp3}-H, ν) ; 2104 (N=N=N, ν) ; 1722 (C=O acide) ; 1699 (C=O carbamate) ; 1686 (C=O amide).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₀H₁₈N₄O₄+Na]⁺ 267,1069 ; trouvé 267,1083 (5,1 ppm),

RMN ¹H (400 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm) : 1,96 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,60 (d, 2H, J = 6,6 Hz, 2H₂) ; 3,46 (dd, 1H, J_{H4-H3} = 5,1 Hz, J_{H4-H4'} = 12,52 Hz, H₄) ; 3,51 (dd, 1H, J_{H4'-H3} = 6,3 Hz, J_{H4'-H4} = 12,5 Hz, H_{4'}) ; 4,10 (m, 1H, H₃) ; 6,19 (d, 1H, J_{NH-H3} = 6,9 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm) : 29,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 37,9 (C₂) ; 49,7 (C₃) ; 55,5 (C₄) ; 80,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 156,9 (C=O Boc) ; 173,5 (C₁).

Dimère « azoture » (**88**)



C₁₄H₂₄N₈O₅

384, 39 g/mol

Le dimère **88** est obtenu en appliquant la procédure *I* de couplage peptidique en utilisant :

- Sel d'acide trifluoroacétique **86** (0,198 g – 0,727 mmol)
- Triéthylamine (0,127 mL – 0,914 mmol)
- Acide **87** (0,186 g – 0,762 mmol)
- HOBT.H₂O (0,124 g – 0,914 mmol)
- EDCi.HCl (0,175 g – 0,914 mmol)
- CH₂Cl₂ (9,1 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 4h. Le milieu est dilué dans CH_2Cl_2 puis lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5%, par H_2O , par une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 et par de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 60:40) pour donner le dimère **88** (0,240 g – 0,625 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 82%

CCM : $R_f = 0,30$ (AcOEt/Cyclohexane 60:40)

PF : 107 – 113°C

$[\alpha]_D^{24} = -32,11$ (c 0,19 – MeOH)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3348 ; 3292 (N-H, ν) ; 3082 ; 2984 (Csp_3 -H, ν) ; 2105 (N=N=N, ν) ; 1741 (C=O ester) ; 1696 (C=O carbamate) ; 1654 (C=O amide).

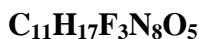
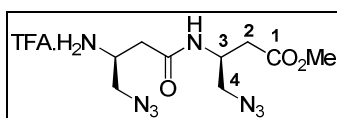
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_5+\text{Na}]^+$ 407,1767 ; trouvé 407,1762 (-1,3 ppm).

HPLC : $t_R = 13,78$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 2,43 (dd, 1H, $J_{\text{H}2\text{A}-\text{H}3\text{A}} = 5,8$ Hz, $J_{\text{H}2\text{A}-\text{H}2'\text{A}} = 15,0$ Hz, $\text{H}_{2\text{A}}$) ; 2,49 (dd, 1H, $J_{\text{H}2'\text{A}-\text{H}3\text{A}} = 6,2$ Hz, $J_{\text{H}2'\text{A}-\text{H}2\text{A}} = 15,0$ Hz, $\text{H}_{2\text{A}'}$) ; 2,57 (dd, 1H, $J_{\text{H}2\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 6,0$ Hz, $J_{\text{H}2\text{B}-\text{H}2'\text{B}} = 16,3$ Hz, $\text{H}_{2\text{B}}$) ; 2,62 (dd, 1H, $J_{\text{H}2'\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 6,0$ Hz, $J_{\text{H}2'\text{B}-\text{H}2\text{B}} = 16,3$ Hz, $\text{H}_{2'\text{B}}$) ; 3,38 (dd, 1H, $J_{\text{H}4\text{A}-\text{H}3\text{A}} = 6,2$ Hz, $J_{\text{H}4\text{A}-\text{H}4'\text{A}} = 12,2$ Hz, $\text{H}_{4\text{A}}$) ; 3,50 (m, 3 H_4) ; 3,68 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 4,01 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{A}}$) ; 4,39 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{B}}$) ; 5,50 (d, 1H, $J_{\text{NH}_\text{A}-\text{H}3\text{A}} = 6,6$ Hz, NH_A) ; 6,56 (d, 1H, $J_{\text{NH}_\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 8,4$ Hz, NH_B).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 28,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 35,5 ($\text{C}_{2\text{B}}$) ; 37,7 ($\text{C}_{2\text{A}}$) ; 45,7 ($\text{C}_{3\text{B}}$) ; 47,7 ($\text{C}_{3\text{A}}$) ; 52,0 (CH_3 CO_2Me) ; 53,2 ($\text{C}_{4\text{B}}$) ; 53,4 ($\text{C}_{4\text{A}}$) ; 79,8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 155,2 (C=O Boc) ; 169,9 ($\text{C}_{1\text{A}}$) ; 171,3 ($\text{C}_{1\text{B}}$).

Trifluoroacétate d'ammonium dimère (89)



398, 30 g/mol

Le sel de TFA **89** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc en utilisant :

- Dimère **88** (0,500g – 1,301 mmol)
- TFA /CH₂Cl₂ (6 mL)

On obtient le sel correspondant (0,518 g – 1,301 mmol) sous forme d'une huile incolore.

Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,46 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

$[\alpha]_D^{25} = -10,2$ (c 0,295 – CHCl₃)

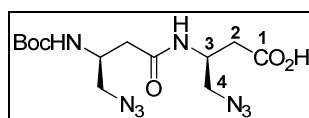
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3088 (N-H, ν) ; 2961 (Csp₃-H, ν) ; 2112 (N=N=N, ν) ; 1780 (C=O acide trifluoroacétique) ; 1728 (C=O ester) ; 1663 (C=O amide).

HR-MS : m/z calculé pour [C₉H₁₆N₈O₃+H]⁺ 285,1424 ; trouvé 285,1419 (-1,6 ppm)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,58 (m, 1H, H_{2B}) ; 2,61 (m, 1H, H_{2A}) ; 2,70 (m, 1H, H_{2'A}) ; 2,81 (m, 1H, H_{2'B}) ; 3,44 – 3,56 (m, 4H, $J_{H4B-H3B} = 5,6$ Hz, $J_{H4B-H4'B} = 12,4$ Hz, H_{4B}) ; 3,50 (dd, 1H, $J_{H4'B-H3B} = 5,9$ Hz, $J_{H4'B-H4B} = 12,4$ Hz, H_{4'B}) ; 3,56 (dd, 1H, $J_{H4A-H3A} = 5,9$ Hz, $J_{H4A-H4'A} = 12,5$ Hz, H_{4A}) ; 3,63 (dd, 1H, $J_{H4'A-H3A} = 5,3$ Hz, $J_{H4'A-JH4A} = 12,5$ Hz, H_{4'A}) ; 3,74 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,77 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,43 (m, 1H, H_{3B}) ; 7,55 (d, 1H, $J_{NH B-H3B} = 8,4$ Hz, NH_B) ; 8,32 (se, 2H, 2H, NH_A).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 35,3 (C_{2A}) ; 35,7 (C_{2B}) ; 46,1 (C_{3B}) ; 49,1 (C_{3A}) ; 52,3 (CH₃ CO₂Me) ; 52,5 (C_{4A}) ; 53,5 (C_{4B}) ; 169,5 (C_{1A}) ; 172,1 (C_{1B}).

Dimère acide « azoture » (90)



370,36 g/mol

L'acide **90** est obtenu en appliquant la procédure générale de saponification d'ester méthylique en utilisant :

- Dimère **88** (0,500 g – 1,301 mmol)
- LiOH.H₂O (0,164 g – 3,902 mmol)
- THF/MeOH/H₂O (3:1:1 – 39 mL)

On obtient 0,466 g (1,256 mmol) d'acide **90** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 97%.

CCM : R_f = 0,39 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 150 – 153 °C

$[\alpha]_D^{21} = -31,8$ (c 0,465 – MeOH)

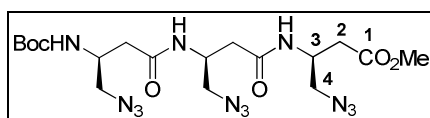
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3397 ; 3331 (N-H, O-H, ν) ; 2980 ; 2932 ; 2868 (C_{sp3}-H, ν) ; 2101 (N=N=N, ν) ; 1722 (C=O acide, ν) ; 1661 (C=O carbamate, ν) ; 1632 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₃H₂₂N₈O₅+Na]⁺ 393, 1611 ; trouvé 393,1604 (-1,7 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,46 (dd, 1H, $J_{H2A-H3A} = 6,8$ Hz, $J_{H2A-H2'A} = 15,0$ Hz, H_{2A}) ; 2,51 (dd, 1H, $J_{H2'A-H3A} = 6,4$ Hz, $J_{H2'A-H2A} = 15,0$ Hz, H_{2'A}) ; 2,61 (d, 2H, $J_{H2B-H3B} = 6,6$ Hz, 2H_{2B}) ; 3,45 – 3,55 (m, 4H, H₄) ; 4,07 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,40 (m, 1H, H_{3B}) ; 6,22 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 7,1$ Hz, NH_A) ; 7,49 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 7,5$ Hz, NH_B)

RMN ¹³C (100 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm) : 29,6 (C(CH₃)₃ Boc) ; 37,5 (C_{2B}) ; 39,7 (C_{2A}) ; 48,1 (C_{3B}) ; 50,2 (C_{3A}) ; 55,2 (C_{4B}) ; 55,4 (C_{4A}) ; 80,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 157,0 (C=O Boc) ; 171,6 (C_{1A}) ; 173,3 (C_{1B}).

Trimère « azoture » (91)



510, 51 g/mol

Le trimère **91** est obtenu en appliquant la procédure générale de couplage peptidique *1* en utilisant :

- Sel de TFA **89** (0,200 g – 0,502 mmol)
- Triéthylamine (0,084 mL – 0,603 mmol)
- Acide **87** (0,123g – 0,502 mmol)
- HOBt.H₂O (0,081 g – 0,603 mmol)
- EDCi.HCl (0,116 g – 0,603 mmol)
- CH₂Cl₂/DMF (2:1 – 6 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont éliminés sous vide. Le résidu est solubilisé dans une grande quantité de CH₂Cl₂ et lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (4x), de nouveau par H₂O (4x) et par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 98:2 à 95:5) pour donner 0,190 g (0,372 mmol) de trimère **89** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 74%

CCM : R_f = 0,30 (AcOEt/Cyclohexane 80:20)

PF : 154 – 157 °C

$[\alpha]_D^{25} = -35,56$ (c 0,18 – MeOH)

IR (pur) v (cm⁻¹) : 3352 ; 3300 (N-H, v) ; 2986 ; 2974 ; 2882 (Csp₃-H, v) ; 2100 (N=N=N, v) ; 1738 ; 1730 (C=O ester) ; 1680 (C=O carbamate) ; 1647 (C=O amide).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₈H₃₀N₁₂O₆+Na]⁺ 533,2309 ; trouvé 533,2303 (-1,1 ppm).

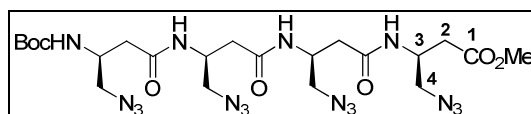
HPLC : t_R = 15,71 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OH) δ (ppm) : 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,26 – 2,37 (m, 2H, 2H_{2A}) ; 2,38–2,39 (m, 2H, 2H_{2B}) ; 2,51 (dd, 1H, J_{H₂C-H₃C} = 8,0 Hz, J_{H₂C-H₂'C} = 16,0 Hz, H₂C) ; 2,58 (dd, 1H, J_{H₂'C-H₃C} = 5,8 Hz, J_{H₂'C-H₂C} = 16,0 Hz, H₂'C) ; 3,34 (m, 2H, 2H_{4A}) ; 3,40 (m, 4H,

2H_{4B}, 2H_{4C}) ; 3,63 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,01 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,27 (m, 1H, H_{3B}) ; 4,31 (m, 1H, H_{3C}) ; 6,70 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,3$ Hz, NH_A) ; 8,04 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 8,1$ Hz, NH_B) ; 8,20 (d, 1H, $J_{NHC-H3C} = 8,0$ Hz, NH_C).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OH) δ (ppm) : 28,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 36,9 (C_{2C}) ; 39,0 (C_{2B}) ; 39,5 (C_{2A}) ; 47,7 (C_{3C}) ; 48,2 (C_{3B}) ; 49,7 (C_{3A}) ; 52,3 (CH₃ CO₂Me) ; 54,5 (C_{4C}) ; 54,6 (C_{4B}) ; 55,0 (C_{4A}) ; 80,4 (C(CH₃)₃ Boc) ; 157,5 (C=O Boc) ; 172,1 (C_{1B}) ; 172,4 (C_{1A}) ; 172,6 (C_{1C}).

Tétramère « azoture » (92)



636, 62 g/mol

Le tétramère **92** est obtenu en appliquant la procédure de couplage peptidique *I* en utilisant :

- Sel de TFA **89** (0,269 g – 0,675 mmol)
- Triéthylamine (0,113 mL – 0,810 mmol)
- Acide **90** (0,250g – 0,675 mmol)
- HOBt.H₂O (0,109 g – 0,810 mmol)
- EDCi.HCl (0,155 g – 0,810 mmol)
- CH₂Cl₂/DMF (2:1 – 7,8 mL).

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4 successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (4x), de nouveau par H₂O (4x). Le produit obtenu est séché sous vide pour donner 0,383 g (0,602 mmol) de tétramère **92** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 89%

CCM : R_f = 0,31 (AcOEt 100%)

PF : 180 – 183 °C

$[\alpha]_D^{25} = -30,67$ (c 0,075 – MeOH)

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3298 ; 3290 (N-H, ν) ; 2986 ; 2974 ; 2897 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, ν) ; 2100 (N=N=N, ν) ; 1738 (C=O ester) ; 1686 (C=O carbamate) ; 1649 (C=O amide).

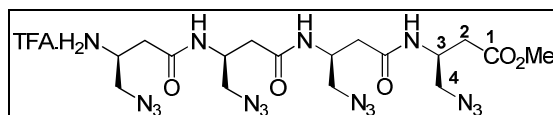
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_{16}\text{O}_7+\text{Na}]^+$ 659,2851 ; trouvé 659,2858 (1,1 ppm).

HPLC : t_{R} = 17,90 min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OH) δ (ppm) : * conformation majoritaire - * conformations minoritaires : 1,40* ; 1,44 \times (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 2,38 (m, 2H, $2\text{H}_{2\text{A}}$) ; 2,40 (m, 4H, $2\text{H}_{2\text{B}}$, $2\text{H}_{2\text{C}}$) ; 2,52 \times ; 2,53 * (2dd, 1H, $J_{\text{H}_{2\text{D}}-\text{H}_{3\text{D}}^*} = 8,0$ Hz, $J_{\text{H}_{2\text{D}}-\text{H}_{2'\text{D}}^*} = 16,1$ Hz, $J_{\text{H}_{2\text{D}}-\text{H}_{3\text{D}}^*} = 8,1$ Hz, $J_{\text{H}_{2\text{D}}-\text{H}_{2'\text{D}}^*} = 16,2$ Hz, $\text{H}_{2\text{D}}$) ; 2,59* (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2'\text{D}}-\text{H}_{3\text{D}}} = 5,8$ Hz, $J_{\text{H}_{2'\text{D}}-\text{H}_{2\text{D}}} = 16,2$ Hz, $\text{H}_{2'\text{D}}$) ; 3,34 (m, 2H, $2\text{H}_{4\text{A}}$) ; 3,40 (m, 6H, $2\text{H}_{4\text{B}}$, $2\text{H}_{4\text{C}}$, $2\text{H}_{4\text{D}}$) ; 3,640 \times ; 3,644* (3s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 4,04 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{A}}$) ; 4,32 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{C}}$) ; 4,34 (m, 2H, $\text{H}_{3\text{B}}$, $\text{H}_{3\text{D}}$) ; 6,70 \times ; 6,75* (2d, 1H, $J_{\text{NHA}-\text{H}_{3\text{A}}^*} = 11,7$ Hz, $J_{\text{NHA}-\text{H}_{3\text{A}}^*} = 8,5$ Hz, NH_{A}) ; 8,03 (d, 1H, $J_{\text{NHB}-\text{H}_{3\text{B}}} = 8,1$ Hz, NH_{B}) ; 8,09* ; 8,13 \times (2d, 1H, $J_{\text{NHC}-\text{H}_{3\text{C}}^*} = 8,2$ Hz, $J_{\text{NHC}-\text{H}_{3\text{C}}^*} = 8,0$ Hz, NH_{C}) ; 8,21* ; 8,25 \times (2d, 1H, $J_{\text{NHD}-\text{H}_{3\text{D}}^*} = 8,0$ Hz, $J_{\text{NHD}-\text{H}_{3\text{D}}^*} = 8,0$ Hz, NH_{D}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OH) δ (ppm) : 28,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 37,0 ($\text{C}_{2\text{D}}$) ; 38,9 ; 39,2 ($\text{C}_{2\text{B}}$, $\text{C}_{2\text{C}}$) ; 39,5 ($\text{C}_{2\text{A}}$) ; 47,6 (3C_3) ; 48,1 ($\text{C}_{3\text{A}}$) ; 52,4 (CH_3 CO_2Me) ; 54,7 ($4\text{C}_{4\text{B}}$) ; 55,1 ($\text{C}_{4\text{A}}$) ; 80,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 157,6 (C=O Boc) ; 172,1 ($\text{C}_{1\text{B}}$) ; 172,2 ($\text{C}_{1\text{C}}$) ; 172,4 ($\text{C}_{1\text{A}}$) ; 172,8 ($\text{C}_{1\text{D}}$).

Trifluoroacétate d'ammonium du tétramère « azoture » (93)



$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_{16}\text{O}_7$

650, 53 g/mol

Le sel d'acide trifluoroacétique **93** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc en utilisant :

- Tétramère (0,133g – 0,209 mmol)
- TFA/ CH_2Cl_2 (4 mL)

On obtient le sel correspondant (0,135 g – 0,209 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

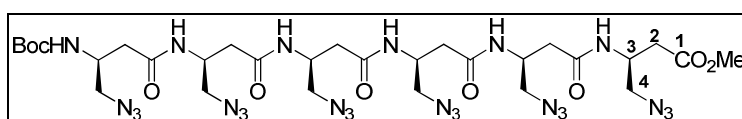
CCM : Rf = 0,37 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 80:20)

HR-MS : m/z calculé pour $[C_9H_{16}N_8O_3+H]^+$ 285,1424 ; trouvé 285,1419 (-1,6 ppm).

RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 2,55 (m, 8H, 8H₂) ; 3,43 (m, 6H, 6H₄) ; 3,71 (m, 6H, CH₃ CO₂Me, 2H₄, 1H₃) ; 4,42 (m, 3H, 3H₃) ; 8,16 (d, 1H, J_{NH-H3} = 8,3 Hz, NH) ; 8,25 (d, 2H, J_{NH-H3} = 8,0 Hz, 2NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 36,1 ; 37,0 ; 38,8 ; 38,9 (4C₂) ; 47,6 ; 48,0 ; 48,1 (4C₃) ; 52,4 (CH₃ CO₂Me) ; 53,2 54,8 55,0 (4C₄) ; 170,8 ; 172,1 ; 172,2 ; 173,1 (4C₁).

Hexamère « azoture » (**94**)



888, 86 g/mol

L'hexamère **94** est obtenu en appliquant la procédure générale de couplage peptidique *I* en utilisant :

- Sel de TFA **93** (0,136 g – 0,209 mmol)
- Triéthylamine (0,025 mL – 0,251 mmol)
- Acide **90** (0,077g – 0,209 mmol)
- HOBt.H₂O (0,034 g – 0,251 mmol)
- EDCi.HCl (0,048 g – 0,251 mmol)
- DMF (2,8 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4 successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (4x), par H₂O (4x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (4x), de nouveau par H₂O (4x). Le produit obtenu est séché sous vide. Le produit est enfin lavé par un mélange THF/MeOH pour donner 0,153 g (0,172 mmol) d'hexamère **94** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 83%

CCM : R_f = 0,31 (AcOEt 100%)

PF : 225 – 228 °C

$[\alpha]_D^{25} = - 10,00$ (c 0,19 – DMF)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3287 (N-H, ν) ; 3080 ; 2980 ; 2901 ; 2881 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, ν) ; 2102 (N=N=N, ν) ; 1730 (C=O ester) ; 1682 (C=O carbamate) ; 1639 (C=O amide).

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_{24}\text{O}_9+\text{H}]^+$ 889,4114 ; trouvé 889,4116 (0,2 ppm).

HPLC : $t_{\text{R}} = 27,86$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

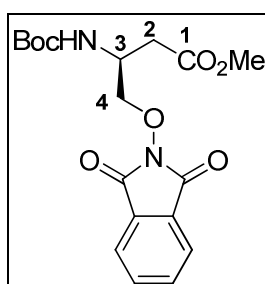
L'hexamère **94** (0,024 g – 0,027 mmol) est ensuite déprotégé au niveau de l'extrémité N-terminale en présence d'un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (1:1) et purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TFA}$ 90:10:1) pour donner le sel de TFA **95** (0,020 g – 0,022 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 82%

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_{24}\text{O}_7+\text{H}]^+$ 789,3577 ; trouvé 789,3590 (-1,7 ppm).

L'hexamère 95 est en cours d'étude.

(S)-3-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(1,3-dioxoisindolin-2-yloxy)butanoate de méthyle (96)



$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$

378,38 g/mol

Sous atmosphère inerte, le DIAD (3,6 mL – 17,15 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0 °C sur une solution d'alcool **77** (3,0 g – 12,86 mmol), de triphénylphosphine (4,5 g – 17,15 mmol) et de N-hydroxysuccinimide (2,8 g – 17,15 mmol) dans 127 mL de THF anhydre. Le milieu est maintenu sous agitation à 0 °C pendant 2h puis concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 40:60). Une deuxième purification par chromatographie flash ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 93:7) est nécessaire afin d'éliminer les traces persistantes de dihydro-diisopropyl-azodicarboxylate. Le produit purifié

crystallise dans Et₂O pour donner le phtalimide **96** (2,87 g – 7,59 mmol) sous forme de fines aiguilles blanches.

Rendement : 59 %

CCM : R_f = 0,56 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

PF : 92 – 97 °C

$[\alpha]_D^{21} = -2,8$ (c 0,495 – CHCl₃)

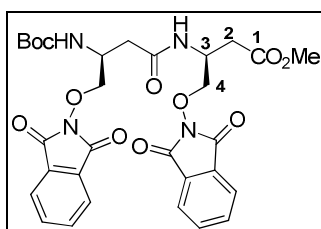
IR (pur) v (cm⁻¹) : 3404 ; 3366 (N-H, v) ; 3003 (Csp²-H, v) ; 2978 ; 2958 (Csp³-H, v) ; 1790 (C=O imide, v) ; 1736 (C=O ester, v) ; 1695 (C=O carbamate, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₈H₂₂N₂O₇+Na]⁺ 401,1325 ; trouvé 401,1338 (3,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,83 (dd, 1H, *J*_{H₂-H₃} = 5,7 Hz, *J*_{H₂-H₂'} = 16,6 Hz, H₂) ; 2,95 (dd, 1H, *J*_{H₂'-H₃} = 3,8 Hz, *J*_{H₂'-H₂} = 16,6 Hz, H₂') ; 3,71 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,24 (m, 2H, 2H₄) ; 4,38 (m, 1H, H₃) ; 5,50 (d, 1H, *J*_{NH-H₃} = 5,8 Hz, NH) ; 7,75 (dd, 2H, ⁴*J* = 3,1 Hz, ³*J* = 5,1 Hz, H_{Ar}) ; 7,83 (dd, 2H, ⁴*J* = 3,1 Hz, ³*J* = 5,1 Hz, H_{Ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,0 (C₂) ; 46,3 (C₃) ; 51,8 (CH₃ CO₂Me), 78,6 (C₄) ; 79,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 123,6 (CH_{Ar}) ; 128,7 (C_{Ar}) ; 134,6 (CH_{Ar}) ; 155,1 (C=O Boc) ; 163,3 (C=O phtalimide) ; 171,7 (C₁).

Dimère phtalimide (**99**)



C₃₀H₃₂N₄O₁₁

624,60 g/mol

Le phtalimide **96** est respectivement déprotégé au niveau de l'extrémité N-terminale en présence d'un mélange TFA/CH₂Cl₂ (**97**) et au niveau de l'extrémité C-terminale en présence de LiOH.H₂O dans THF/MeOH/H₂O (**98**) selon les procédures générales de déprotection. Le dimère **99** est obtenu en appliquant la procédure générale de couplage peptidique *I* en utilisant :

- Sel d'acide trifluoroacétique **97** (0,251 g – 0,641 mmol)

- Triéthylamine (0,065 mL – 0,641 mmol)
- Acide **98** (0,195 g – 0,641 mmol)
- HOBt.H₂O (0,087 g – 0,641 mmol)
- EDCi.HCl (0,123 g – 0,641 mmol)
- CH₂Cl₂ (5 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 9h. Le milieu est dilué dans CH₂Cl₂ puis lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5%, par H₂O, par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ et par de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 70:30) pour donner le dimère **99** (0,100 g – 0,160 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 25 %

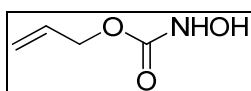
CCM : R_f = 0,34 (AcOEt/Cyclohexane 80:20)

HR-MS : m/z calculé pour [C₃₀H₃₂N₄O₁₁+Na]⁺ 647,197 ; trouvé 647,1960 (-1,49 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,73 (dd, 1H, J_{H2A-H3A} = 6,1 Hz, J_{H2A-H2'A} = 14,5 Hz, H_{2A}) ; 2,89 (d, 2H, J = 6,5 Hz, H_{2B}) ; 2,91 (m, 1H, H_{2'A}) ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,19 (m, 2H, H_{3A} H_{4A}) ; 4,27 (dd, 1H, J_{H4B-H3B} = 4,8 Hz, J_{H4B-H4'B} = 10,2 Hz, H_{4B}) ; 4,42 (dd, 1H, J_{H4'A-H3A} = 3,5 Hz, J_{H4'A-H4A} = 9,1 Hz, H_{4'A}) ; 4,47 (dd, 1H, J_{H4'B-H3B} = 4,3 Hz, J_{H4'B-H4B} = 10,2 Hz, H_{4'B}) ; 4,62 (m, 1H, H_{3B}) ; 5,75 (d, 1H, J_{NHA-H3A} = 6,8 Hz, NH_A) ; 7,19 (d, 1H, J_{NHB-H3B} = 8,2 Hz, NH_B) ; 7,70 (m, 4H, 4H_{Ar}) ; 7,77 (m, 4H, 4H_{Ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,3 (C(CH₃)₃ Boc) ; 34,9 (C_{2B}) ; 36,8 (C_{2A}) ; 45,3 (C_{3B}) ; 46,7 (C_{3A}) ; 51,9 (CH₃ CO₂Me) ; 78,2 (C_{4A}) ; 79,2 (C_{4B}) ; 123,6 (CH_{Ar}) ; 128,7 ; 128,8 (C_{Ar}) ; 134,5 ; 134,6 (CH_{Ar}) ; 155,2 (C=O Boc) ; 163,4 ; 163,5 (C=O phtalimide) ; 170,3 ; 171,4 (C_{1A}, C_{1B}).

Allyl-hydroxycarbamate (**100**)



117,10 g/mol

Le chloroformate d'allyle (3,8 mL – 35,9 mmol) est ajouté goutte à goutte à 0°C à une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (5,0 g – 71,9 mmol) et de NaOH (4,3 mL – 107,9 mmol) dans 36 mL d'H₂O (*qsp* 2,0M en hydroxylamine). Le milieu est maintenu sous agitation à 0°C pendant 1h30. Le pH est ajusté à 1 par ajout d'une solution aqueuse d'HCl 12N puis le milieu extrait par Et₂O. Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. On obtient le composé **100** (4,04 g – 34,5 mmol) sous forme d'une huile incolore.

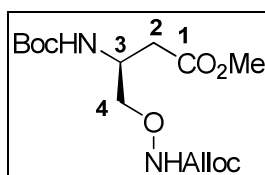
Rendement : 96 %

CCM : R_f = 0,43 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 4,61 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂) ; 5,21 (dt, 1H, *J* = 1,2 Hz, *J* = 10,4 Hz, CH₂-CH=CH₂) ; 5,30 (m, 1H, CH₂-CH=CH₂) ; 5,88 (m, *J* = 5,7 Hz, *J* = 11,3 Hz, *J* = 17,0 Hz, CH₂-CH=CH₂) ; 7,81 (m, 1H, NHOH).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁴⁵

**(S)-4-(Allyloxycarbonylaminoxy)-3-(tert-butoxycarbonylamino)butanoate de méthyle
(101)**



332,35 g/mol

Une solution de (*S*)-4-(aminoxy)-3-(tert-butoxycarbonylamino)butanoate de méthyle **102** (4,31 g – 17,33 mmol) dans 130 mL de CH₂Cl₂ est traitée par de la DIPEA (3,4 mL – 19,07 mmol) à température ambiante pendant 30 min. Le chloroformate d'allyl (2,03 mL – 19,07 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est maintenu sous agitation pendant 8h puis concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane, 40:60) pour donner le composé **101** (5,47 g – 16,46 mmol) sous forme d'une huile incolore.

Rendement : 95 %

CCM : R_f = 0,76 (AcOEt/Cyclohexane 60:40)

[α]_D²¹ = +54,5 (c 0,670 – CHCl₃)

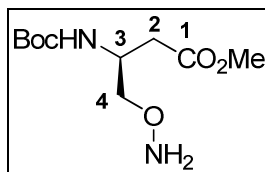
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3273 (N-H, ν) ; 2978 ; 2953 (Csp₃-H, ν) ; 1721 (C=O ester ; ν) ; 1694 ; 1651 (C=O carbamate).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₄H₂₄N₂O₇+Na]⁺ 355,1481 ; trouvé 355,1472 (-2,6 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,58 (dd, 1H, $J_{H_2-H_3} = 5,6$ Hz, $J_{H_2-H_2'} = 16,4$ Hz, H₂) ; 2,64 (dd, 1H, $J_{H_2'-H_3} = 6,1$ Hz, $J_{H_2'-H_2} = 16,4$ Hz, H_{2'}) ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,87 (d, 2H, $J_{H_4'-H_3} = 6,0$ Hz, 2H₄) ; 4,24 (m, 1H, H₃) ; 4,62 (dt, 2H, $J = 1,2$ Hz, $J = 5,7$ Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,23 (dd, 1H, $J = 1,2$ Hz, $J = 10,4$ Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,31 (dd, 1H, $J = 1,3$ Hz, $J = 17,1$ Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,36 (m, 1H, NH) ; 5,90 (m, 1H, $J = 5,7$ Hz, $J = 10,4$ Hz, $J = 17,0$ Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 8,17 (bs, 1H, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,2 (C₂) ; 45,6 (C₃) ; 51,8 (CH₃ CO₂Me) ; 68,2 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 77,3 (C₄) ; 79,8 (C(CH₃)₃ Boc) ; 118,4 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,9 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 155,9 (C=O Boc) ; 157,1 (C=O Alloc) ; 171,6 (C₁).

(S)-4-(aminooxy)-3-(tert-butoxycarbonylamino)butanoate de méthyle (102)



248,28 g/mol

Une solution de phtalimide **96** (2,0 g – 5,23 mmol) dans 30 mL d'un mélange $CH_2Cl_2/MeOH$ (90 : 10) est traitée sous atmosphère inerte par de l'hydrazine (0,26 mL – 5,23 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 3h30 puis concentré sous vide. Le résidu est solubilisé dans Et_2O froid afin de précipiter le phtalimide hydrazine qui est filtré sur célite. Le filtrat est concentré sous vide. L'opération est répétée deux fois afin d'obtenir le composé **102** (0,909 g – 3,66 mmol) sous forme d'une huile légèrement jaune qui est utilisée sans purification.

Rendement : 70 %

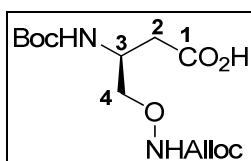
CCM : Rf = 0,67 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

HR-MS : m/z calculé pour $[C_{10}H_{20}N_2O_5+Na]^+$ 271,1270 ; trouvé 271,1258 (- 4,4 ppm).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$ Boc) ; 2,52 (dd, 1H, $J_{H_2-H_3} = 5,7$ Hz, $J_{H_2-H_2'} = 16,0$ Hz, H_2) ; 2,57 (dd, 1H, $J_{H_2'-H_3} = 6,3$ Hz, $J_{H_2'-H_2} = 16,0$ Hz, H_2') ; 3,64 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 3,64 (m, 1H, H_4) ; 3,69 (dd, 1H, $J_{H_4'-H_3} = 6,0$ Hz, $J_{H_4'-H_4} = 11,0$ Hz, H_4') ; 4,21 (m, 1H, H_3) ; 5,28 (m, 3H, NHBoc, ONH_2).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 28,2 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 35,7 (C_2) ; 46,3 (C_3) ; 51,6 (CH_3 CO_2Me), 76,3 (C_4) ; 79,4 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 155,4 ($C=O$ Boc) ; 171,8 (C_1).

Acide (S)-4-(allyloxycarbonylaminoxy)-3-(tert-butoxycarbonylamino)butanoïque (104)



318,32 g/mol

L'acide **104** est obtenu en appliquant la procédure générale de saponification d'un ester méthylique en utilisant :

- Ester **101** (2,5 g – 7,52 mmol)
- LiOH.H₂O (0,947 g – 22,56 mmol)
- THF/MeOH/H₂O (226 mL)

On obtient 2,23 g (7,0 mmol) d'un mélange d'isomères inséparables sous forme d'un solide blanc cristallisé.

Rendement : 93%

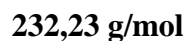
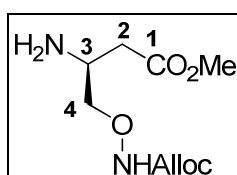
CCM : R_fmajoritaire = 0,48 (CH₂Cl₂/MeOH 90 : 10) - R_fminoritaire = 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH 90 : 10)

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₃H₂₂N₂O₇+Na]⁺ 341,1325 ; trouvé 341,1313 (-3,4 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *isomère majoritaire* : 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,62 (m, 2H, H₂) ; 3,87 (m, 2H, 2H₄) ; 4,20 (m, 1H, H₃) ; 4,60 (d, 2H, J = 5,6 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,21 (d, 1H, J = 10,5 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,24 (d, 1H, J = 16,8 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,51 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NH) ; 5,88 (m, 1H, J = 5,6 Hz, J = 10,5 Hz, J = 17,2 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 8,49 (bs, 1H, NH') - *isomère minoritaire* : 5,56 (d, 1H, J = 6,1 Hz, NH) ; 8,37 (bs, 1H, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,3 (C₂) ; 45,6 (C₃) ; 66,4 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 77,3 (C₄) ; 80,0 (C(CH₃)₃ Boc) ; 118,5 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,8 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 156,1 (C=O Boc) ; 157,4 (C=O Alloc) ; 175,0 (C₁).

(S)-4-(allyloxycarbonylaminoxy)-3-aminobutanoate (109)



L'amine **109** est obtenue en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc en utilisant :

- Composé **101** (2,01g – 6,05 mmol)
- TFA/CH₂Cl₂ (1:1 - 11mL)

On obtient le sel d'acide trifluoroacétique qui est solubilisé dans CH₂Cl₂ puis neutralisé par ajout d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂ (1x) puis avec AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide pour donner l'amine libre correspondante **109** (1,32 g – 5,69 mmol) sous forme d'une huile jaunâtre.

Rendement : 94 %

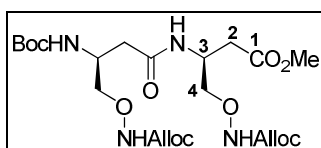
CCM : R_f = 0,33 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

HR-MS : m/z calculé pour [C₉H₁₇N₂O₅+H]⁺ 233,1137 ; trouvé 233,1232 (-2,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,69 (d, 1H, *J* = 16,0 Hz, H₂) ; 2,84 (m, 1H, H₂') ; 3,71 (s, 3H, CH₃ ester) ; 3,95 (se, 1H, H₃) ; 4,07 (m, 2H, 2H₄) ; 4,61 (d, 2H, *J* = 5,1 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,25 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,31 (d, 1H, *J* = 16,5 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,87 (m, 1H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 10,5 Hz, *J* = 16,5 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 8,19 (se, 2H, NH₂) ; 8,85 (se, 1H, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 31,9 (C₂) ; 47,3 (C₃) ; 52,6 (CH₃ CO₂Me) ; 67,2 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 75,3 (C₄) ; 119,2 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,1 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 159,6 (C=O Alloc) ; 171,1 (C₁).

Dimère « Alloc » (106)



532,54 g/mol

Le dimère **106** est obtenu en appliquant la *procédure générale* de couplage peptidique en présence de HATU/collidine en utilisant :

- Amine libre **109** (0,016 g – 0,071 mmol)
- Acide 104 (0,016 g – 0,051 mmol)
- 2,4,6-collidine (0,008 mL – 0,064 mmol)
- HATU (0,019 g – 0,051 mmol).
- CH₂Cl₂/DMF (4:1 – 10,2 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 8h. Le milieu est concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 70:30) pour donner le dimère **106** (0,016 g – 0,03 mmol) sous forme d'une huile incolore qui cristallise avec le temps.

Rendement : 59 %

CCM : R_f = 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

PF : 86 – 89°C

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3308 ; 3269 (N-H, ν) ; 3082 (Csp²-H, ν) ; 2978 ; 2953 ; 2935 (Csp³-H, ν) ; 1732 (C=O ester, ν) ; 1712 ; 1694 (C=O carbamate, ν) ; 1651 (C=O amide, ν).

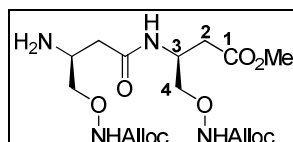
$[\alpha]_D^{21} = +11,43$ (c 0,245 – MeOH)

HR-MS : m/z calculé pour [C₂₂H₃₆N₄O₁₁+Na]⁺ 555,2278 ; trouvé 555,2272 (-1,1 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,52 (d, 2H, J = 5,7 Hz, 2H_{2A}) ; 2,56 (dd, 1H, J_{H_{2B}-H_{2'B}} = 16,5 Hz, H_{2B}) ; 2,62 (dd, 1H, J_{H_{2'B}-H_{3B}} = 6,7 Hz, J_{H_{2'B}-H_{2B}} = 16,5 Hz, H_{2'B}) ; 3,66 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,77 (dd, 1H, J_{H_{4A}-H_{3A}} = 6,3 Hz, J_{H_{4A}-H_{4'A}} = 9,9 Hz, H_{4A}) ; 3,90 (m, 3H, H_{4'A}, 2H_{4B}) ; 4,13 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,55 (m, 1H, H_{3B}) ; 4,60 (dd, 4H, J = 1,3 Hz, J = 5,7 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,23 (dt, 2H, J = 1,1 Hz, J = 10,4 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,31 (dd, 2H, J = 1,4 Hz, J = 17,2 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,70 (d, 1H, J_{NHA-H3A} = 8,1 Hz, NH_A) ; 5,89 (m, 2H, J = 5,7 Hz, J = 10,5 Hz, J = 17,2 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 7,23 (d, 1H, J_{NHB-H3B} = 8,1 Hz, NH_B) ; 8,41 (se, 1H, NH') ; 8,48 (se, 1H, NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,3 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,0 (C_{2A}) ; 37,2 (C_{2B}) ; 44,8 (C_{3B}) ; 46,3 (C_{3A}) ; 51,9 (CH₃ CO₂Me) ; 66,2 ; 66,4 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 76,8 (C_{4A}) ; 77,1 (C_{4B}) ; 79,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 118,5 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,9 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 155,8 (C=O Boc) ; 157,2 ; 157,5 (C=O Alloc) ; 171,1 (C_{1A}) ; 171,3 (C_{1B}).

Dimère amine (110)



C₁₇H₂₈N₄O₉

432,43 g/mol

L'amine 110 est obtenue en appliquant la *procédure générale* de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc en utilisant :

- composé **106** (0,104 g – 0,195 mmol)
- TFA/CH₂Cl₂ (1:1 – 1 mL)

On obtient le sel de TFA qui est solubilisé dans CH₂Cl₂ puis neutralisé par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂ (1x) puis avec AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide pour donner l'amine libre correspondante **110** (0,084 g – 0,195 mmol) sous forme d'une huile jaunâtre.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,47 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

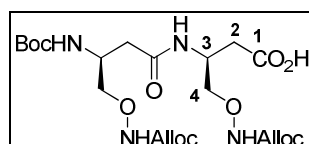
HR-MS : m/z calculé pour [C₁₇H₂₈N₄O₉+H]⁺ 433,1935 ; trouvé 433,1936 (0,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,23 (dd, 1H, *J*_{H_{2A}-H_{3A}} = 7,6 Hz, *J*_{H_{2A}-H_{2'A}} = 14,1 Hz, H_{2A}) ; 2,41 (dd, 1H, *J*_{H_{2'A}-H_{3A}} = 4,0 Hz, *J*_{H_{2'A}-H_{2A}} = 14,0 Hz, H_{2'A}) ; 2,56 (dd, 2H, *J*_{H_{2B}-H_{3B}} = 6,4 Hz, 2H_{2B}) ; 3,41 (m, 1H, H_{3A}) ; 3,63 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,75 (m, 2H, 2H_{4A}) ; 3,84 (m, 2H, 2H_{4B}) ; 4,52 (m, 1H, H_{3B}) ; 4,57 (dd, 4H, *J* = 0,8 Hz, *J* = 5,7 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,19 (dt, 2H, *J* = 1,1 Hz, *J* = 10,5 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,27 (d, 2H, *J* = 16,8 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,86 (m, 2H, *J* = 5,7 Hz, *J* = 10,5 Hz, *J* = 16,8 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 7,73 (d, 1H, *J*_{NHB-H_{3B}} = 8,5 Hz, NH_B).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 35,1 (C_{2B}) ; 40,0 (C_{2A}) ; 44,7 (C_{3B}) ; 47,3 (C_{3A}) ; 51,8 (CH₃ CO₂Me) ; 68,1 ; 68,2 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 77,1 ; 80,1 (2C₄) ; 118,4 ; 118,5

(CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,9 ; 131,9 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 157,2 ; 157,6 (C=O Alloc) ; 171,4 (C_{1B}) ; 171,6 (C_{1A}).

Dimère acide (112)



C₂₁H₃₄N₄O₁₁

518,51 g/mol

L'acide **112** est obtenu en appliquant la procédure générale de saponification d'un ester méthylique en utilisant :

- Ester **106** (0,064 g – 0,120 mmol)
- LiOH.H₂O (0.015 g – 0,361 mmol)
- THF/MeOH/H₂O (3,6 mL)

On obtient 0,058 g (0,11 mmol) d'un mélange d'isomères inséparables sous forme d'un solide blanc cristallisé.

Rendement : 93 %

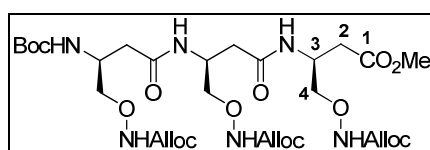
CCM : R_f = 0,50 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

HR-MS : m/z calculé pour [C₂₁H₃₄N₄O₁₁+Na]⁺ 541,2122 ; trouvé 541,2120 (-0,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,56 (m, 4H, 2H_{2A}, 2H_{2B}) ; 3,88 (m, 4H, 2H_{4A}, 2H_{4B}) ; 4,15 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,54 (m, 1H, H_{3B}) ; 4,60 (d, 4H, *J* = 5,5 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,22 (d, 2H, *J* = 10,6 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,31 (d, 2H, *J* = 16,8 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,87 (m, 1H, NH_A) ; 5,89 (m, 2H, *J* = 5,5 Hz, *J* = 10,6 Hz, *J* = 16,8 Hz, CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 7,45 (se, 1H, NH_B) ; 8,79 (se, 2H, 2NH').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,3 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,3 ; 37,3 (C₂) ; 45,0 ; 46,6 (C₃) ; 66,4 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 77,1 (2C₄) ; 79,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 118,6 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,9 (CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 156,1 (C=O Boc) ; 157,5 ; 157,6 (C=O Alloc) ; 171,7 (2C₁).

Trimère « Alloc » (111)



732,73 g/mol

Le trimère **111** est obtenu en appliquant la *procédure générale* de couplage peptidique en présence de HATU/collidine en utilisant :

- Amine libre **110** (0,189 g – 0,438 mmol)
- Acide **104** (0,158 g – 0,496 mmol)
- 2,4,6-Collidine (0,071 mL – 0,547 mmol)
- HATU (0,167 g – 0,438 mmol).
- CH₂Cl₂/DMF (4:1 – 96 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 8h. Le milieu est concentré sous vide. Le produit brut est purifié par flash chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95 : 5) pour donner 0,132 g (0,180 mmol) de trimère **111** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 41 %

CCM : R_f = 0,17 (CH₂Cl₂/MeOH 95 : 5)

PF : 79 – 82 °C

$[\alpha]_D^{21} = +54,8$ (c 0,330 – CHCl₃)

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3341 ; 3304 ; 3288 ; 3240 (N-H, ν) ; 2982 ; 2949 (Csp₃-H, ν) ; 1741 (C=O ester, ν) ; 1720 ; 1681 (C=O carbamate) ; 1647 ; 1624 (C=O amide, ν).

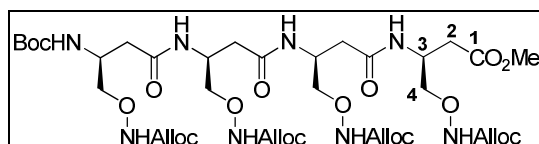
HR-MS : m/z calculé pour [C₃₀H₄₈N₆O₁₅+H]⁺ 733,3256 ; trouvé 733,3265 (1,2 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,49 (m, 4H, 2H_{2A} 2H_{2B}) ; 2,58 (d, 2H, J = 6,4 Hz, 2H_{2C}) ; 3,64 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,76 3,96 (m, 6H, 6H₄) ; 4,15 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,45 (m, 1H, H_{3B}) ; 4,52 (m, 1H, H_{3C}) ; 4,58 (m, 6H, 6CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,20 (d, 3H, J = 10,4 Hz, 3CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,28 (m, 3H, 3CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,79 (d, 1H, J_{NHA-H3A} = 8,2 Hz, NH_A) ; 5,81 – 5,93 (m, 3H, 3CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 7,36 (m, 1H, NH_B) ; 7,37 (m, 1H, NH_C) ; 8,77 – 8,81 (s, 3H, 3NHAlloc).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28,3 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,0 (C_{2C}) ; 37,3 (C_{2A} C_{2B}) ; 45,0 (C_{3C}) ; 45,4 (C_{3B}) ; 46,4 (C_{3A}) ; 51,9 (CH₃ CO₂Me) ; 66,2 ; 66,3 (3CH₂-CH=CH₂ Alloc) ;

77,0 (3C₄) ; 79,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 118,4 ; 118,5 ; 118,5 (3CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 131,9 ; 131,9 ; 132,0 (3CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 155,9 (C=O Boc) ; 157,3 ; 157,4 ; 157,5 (3C=O Alloc) ; 170,9 (C₁) ; 171,0 (C_{1C}) ; 171,4 (C₁).

Tétramère « Alloc » (113)



C₃₈H₆₀N₈O₁₉

932,93 g/mol

Le tétramère **113** est obtenu en appliquant la *procédure générale* de couplage peptidique en présence de HATU/collidine en utilisant :

- Amine libre 110 (0,060 g – 0,139 mmol)
- Acide **112** (0,091 g – 0,091 mmol)
- 2,4,6-Collidine (0,015 mL – 0,114 mmol)
- HATU (0,035 g – 0,091 mmol).
- CH₂Cl₂/DMF (4:1 – 18,2 mL)

L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 8h. Le milieu est concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) pour donner 0,045 g (0,048 mmol) de tétramère **113** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 53 %

CCM : R_f = 0,35 (CH₂Cl₂/MeOH 80: 20)

PF : 127 – 130°C

$[\alpha]_D^{21} = + 4,0$ (c 0,100 – MeOH)

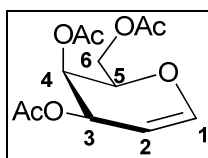
HR-MS : m/z calculé pour [C₃₈H₆₀N₈O₁₉+H]⁺ 933,4053 ; trouvé 933,4064 (1,2 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,48 (C(CH₃)₃ Boc) ; 2,80 – 2,99 (m, 7H, 7H₂) ; 3,05 (dd, 1H, J_{H₂-H₃} = 5,8 Hz, J_{H₂-H₂'} = 16,0 Hz, 1H₂) ; 3,59 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,28 – 4,47 (m, 8H, 8H₄) ; 4,68 – 4,79 (m, 8H, 8CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 4,84 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,03 – 5,22 (m, 7H, 3H₃, 4CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,33 (m, 4H, 4CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 5,97 (m, 4H, 4CH₂-CH=CH₂ Alloc) ; 7,65 (d, 1H, J_{NH_A-H_{3A}} = 8,6 Hz, NH_A) ; 8,87 (d, 1H, J_{NH-H₃} = 7,0 Hz,

1NH) ; 8,90 (d, 1H, $J_{NH-H3} = 8,4$ Hz, 1NH) ; 9,03 (d, 1H, $J_{NH-H3} = 7,6$ Hz, 1NH) ; 11,49 – 11,82 (m, 4H, 4NH').

RMN ^{13}C (100 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm) : 28,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 36,6 ; 38,6 ; 38,9 ; 38,5 (4C₂) ; 46,4 ; 46,9 ; 47,0 (4C₃) ; 52,1 (CH₃ CO₂Me) ; 66,3 (CH₂(CH=CH₂)) ; 78,1 ; 78,1 ; 78,4 (4C₄) ; 118,1 (CH₂-CH=CH₂) ; 133,8 (CH₂-CH=CH₂) ; 158,6 (C=O Boc, C=O Alloc) ; 171,4 ; 171,5 ; 171,5 (3C₁) ; 172,2 (C_{1D}).

3,4,6-Tri-*O*-acétyl-D-galactal (**119**)



272,25 g/mol

Dans un réacteur de 1 litre, muni d'une agitation mécanique de type « demi-lune » et d'un thermomètre, 1,2 mL d'acide perchlorique 70% aqueux sont ajoutés goutte à goutte et sous agitation à une suspension de 0,3 g (1,7 mmol – 0,006 éq.) de D-galactose dans 200 mL d'anhydride acétique. 50 g (277 mmol – 1,0 éq.) de D-galactose supplémentaires sont ajoutés par portions sur une période de 1 h. Pendant l'addition, la température du milieu réactionnel est maintenue à 40°C en refroidissant si nécessaire avec un bain eau-glace. Après addition complète, la solution est refroidie à 23°C et 220 mL d'acide bromhydrique 33% dans l'acide acétique sont ajoutés. Le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 1,5 h puis dilué dans 470 mL de CH₂Cl₂. La phase organique obtenue est successivement lavée par de l'eau glacée (2x135mL), neutralisée par une solution aqueuse de NaHCO₃ 5% froide jusqu'à pH = 3-5 puis séchée sur Na₂SO₄ et concentrée sous vide pour donner le dérivé bromé **118** sous forme d'un sirop jaune.

Rendement : brut : 98 %

CCM : R_f = 0,56 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

Dans un réacteur de 1 litre, muni d'une agitation mécanique de type « demi-lune » et d'un thermomètre à froid, le dérivé bromé **118** (112,3 g – 273 mmol) est ajouté lentement sur 1h sur une suspension de zinc (126,7 g – 1938 mmol) dans 800 mL d'acide acétique 50% aqueux. La température du milieu est maintenue entre -15°C et -20°C par un bain acétone/N₂.

Après addition complète, le milieu est maintenu sous agitation pendant 1h supplémentaire à 0°C puis filtré. Le filtrat est dilué dans 530 mL de CH₂Cl₂ puis lavé par de l'eau glacée (3x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (2x) et par de la saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 30:70) pour donner le 3,4,6-tri-*O*-acétyl-D-galactal **119** (27,5 g – 101 mmol) sous forme d'un sirop incolore.

Rendement : 37%

CCM : R_f = 0,7 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

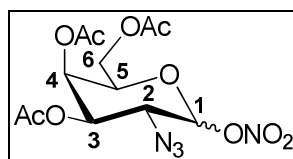
$[\alpha]_D^{22} = -19,0$ (c 1,0 CHCl₃)

IR (CCl₄) ν (cm⁻¹) : 3079 (Csp₂-H, ν) ; 2968 (Csp₃-H, ν) ; 1751 (C=O ester, ν) ; 1652 (C=C, ν).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,99 ; 2,05 ; 2,09 (3s, 9H, CH₃ OAc) ; 4,19 (dd, 1H, $J_{H6-H5} = 5,4$ Hz, $J_{H6-H6'} = 11,4$ Hz, H₆) ; 4,24 (dd, 1H, $J_{H6'-H5} = 7,2$ Hz, $J_{H6'-H6} = 11,4$ Hz, H_{6'}) ; 4,29 (m, 1H, H₅) ; 4,70 (ddd, 1H, $J_{H2-H4} = 1,5$ Hz, $J_{H2-H3} = 2,6$ Hz, $J_{H2-H1} = 6,3$ Hz, H₂) ; 5,39 (m, 1H, $J_{H4-H5} = 1,6$ Hz, $J_{H4-H3} = 4,4$ Hz, H₄) ; 5,52 (m, 1H, H₃) ; 6,43 (dd, 1H, $J_{H1-H3} = 1,7$ Hz, $J_{H1-H2} = 6,3$ Hz, H₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,7 ; 20,7 ; 20,8 (CH₃ OAc) ; 61,9 (C₆) ; 63,7 (C₃) ; 63,9 (C₄) ; 72,8 (C₅) ; 98,8 (C₂) ; 145,4 (C₁) ; 170,1 ; 170,3 ; 170,5 (C=O OAc).

Nitrate de 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranosyl (**120**)



C₁₂H₁₆N₄O₁₀

376,28 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution de galactal **119** (2,44 g – 8,95 mmol) dans 65,4 mL d'acétonitrile anhydre refroidie à -15°C est ajoutée sous agitation vigoureuse à -15°C sur un mélange de NaN₃ (0,873 g – 13,42 mmol) et de CAN (14,7 g – 26,86 mmol) préalablement séché sous vide pendant une nuit. Le milieu est maintenu sous agitation à -15°C pendant 4h puis à température ambiante pendant la nuit. 45 mL d'Et₂O froid et 45 mL d'eau glacée sont

ajoutés et le milieu est filtré sur Célite. La phase aqueuse est extraite à l'Et₂O et les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 50:50) pour donner un mélange des deux anomères (ratio $\alpha/\beta = 70:30$) du nitrate de 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranosyl **120** (1,71 g – 4,5 mmol) sous forme d'un solide incolore.

Rendement : 51%

CCM : Rf = 0,58 (AcOEt/Cyclohexane 40:60)

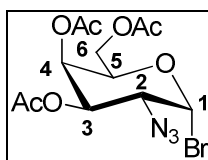
PF : 91 – 96 °C (mélange $\alpha+\beta$)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 2968 ; 2927 ; 2907 (Csp₂-H, ν) ; 2127 (N=N=N, ν) ; 1752 ; 1743 (C=O ester, ν).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *anomère α* : 2,02 ; 2,06 ; 2,16 (3s, 9H, CH₃ OAc) ; 4,05 (m, 1H, H_{2 α}) ; 4,10 (m, 2H, 2H_{6 α}) ; 4,35 (td, 1H, $J_{H5\alpha-H4\alpha} = 0,72$ Hz, $J_{H5\alpha-H6\alpha/H6'\alpha} = 6,6$ Hz, H_{5 α}) ; 5,23 (dd, 1H, $J_{H3\alpha-H4\alpha} = 3,2$ Hz, $J_{H3\alpha-H2\alpha} = 11,3$ Hz, H_{3 α}) ; 5,49 (dd, 1H, $J_{H4\alpha-H5\alpha} = 1,1$ Hz, $J_{H4\alpha-H3\alpha} = 3,1$ Hz, H_{4 α}) ; 6,33 (d, 1H, $J_{H1\alpha-H2\alpha} = 4,1$ Hz, H_{1 α}) – *anomère β* : 2,03 ; 2,06 ; 2,16 (3s, 9H, CH₃ OAc) ; 3,81 (dd, $J_{H2\beta-H1\beta} = 8,8$ Hz, $J_{H2\beta-H3\beta} = 10,6$ Hz, H_{2 β}) ; 4,10 (m, 2H, 2H_{6 β}) ; 4,16 (dd, 1H, $J_{H5\beta-H6\beta} = 4,9$ Hz, $J_{H5\beta-H6'\beta} = 6,1$ Hz, H_{5 β}) ; 4,95 (dd, 1H, $J_{H3\beta-H4\beta} = 3,2$ Hz, $J_{H3\beta-H2\beta} = 10,5$ Hz, H_{3 β}) ; 5,38 (dd, 1H, $J_{H4\beta-H5\beta} = 0,6$ Hz, $J_{H4\beta-H3\beta} = 3,1$ Hz, H_{4 β}) ; 5,57 (d, 1H, $J_{H1\beta-H2\beta} = 8,8$ Hz, H_{1 β}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *anomère α* : 20,6 (CH₃ OAc) ; 60,9 (C_{6 α}) ; 69,4 (C_{5 α}) ; 68,6 (C_{3 α}) ; 66,6 (C_{4 α}) ; 71,8 (C_{2 α}) ; 96,9 (C_{1 α}) ; 169,5 ; 169,8 ; 170,4 (C=O OAc) – *anomère β* : 20,6 (CH₃ OAc) ; 57,4 (C_{2 β}) ; 61,2 (C_{6 β}) ; 71,7 (C_{3 β}) ; 65,8 (C_{4 β}) ; 98,1 (C_{1 β}) ; 169,5 ; 169,8 ; 170,4 (C=O OAc).

Bromure de 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyle (**121**)



C₁₂H₁₆BrN₃O₇

394,18 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution de nitrate **120** (2,46 g – 6,54 mmol) dans 24 mL d'acétonitrile anhydre est traité à température ambiante pendant 8h par LiBr (2,83 g – 32,69

mmol), préalablement séché sous vide pendant la nuit. Le milieu est dilué dans 200 mL de CH₂Cl₂ et lavé par H₂O (2x). La phase organique obtenue est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 25:75) pour donner uniquement l'anomère α du dérivé bromé **121** (2,19 g – 5,56 mmol) sous forme d'un solide jaunâtre.

Rendement : 85%

CCM : R_f = 0,44 (AcOEt/Cyclohexane 25:75)

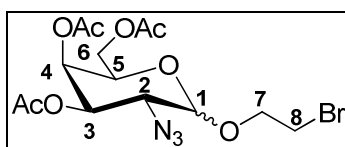
$[\alpha]_D^{22} = +190,4$ (c 2,0, CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 2978 (C_{sp3}-H, v) ; 2114 (N=N=N, v) ; 1748 (C=O ester, v).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,02 ; 2,03 ; 2,13 (3s, 9H, CH₃ OAc) ; 3,90 (dd, 1H, $J_{H2-H1} = 3,8$ Hz, $J_{H2-H3} = 10,7$ Hz, H₂) ; 4,08 (dd, 1H, $J_{H6-H5} = 6,8$ Hz, $J_{H6-H6'} = 11,4$ Hz, H₆) ; 4,15 (dd, 1H, $J_{H6\alpha-H5} = 6,3$ Hz ; $J_{H6'-H5} = 11,4$ Hz, H_{6'}) ; 4,46 (m, 1H, $J_{H5-H6} = 6,5$ Hz, H₅) ; 5,31 (dd, 1H, $J_{H3-H4} = 3,2$ Hz, $J_{H3-H2} = 10,7$ Hz, H₃) ; 5,48 (dd, 1H, $J_{H4-H5} = 1,1$ Hz, $J_{H4-H3} = 3,1$ Hz, H₄) ; 6,44 (d, 1H, $J_{H1-H2} = 3,8$ Hz, H₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,5 ; 20,8 (CH₃ OAc) ; 58,5 (C₂) ; 60,7 (C₆) ; 66,5 (C₄) ; 69,8 (C₃) ; 71,4 (C₅) ; 88,9 (C₁) ; 169,4 ; 169,7 ; 170,2 (C=O OAc).

2'-bromoéthyl-3,4,6-tri-O-acétyl-2-azido-2-deoxy-α/β-D-galactopyranosyle (**122**)



C₁₄H₂₀BrN₃O₈

438,23 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution de dérivé bromé **121** (1,18 g – 2,99 mmol) dans 30 mL de CH₂Cl₂ anhydre est traitée par du 2-bromoéthanol (0,151 mL – 0,267 mmol) et par de la 2,4,6-collidine (distillée, stockée sur tamis moléculaire 4Å). Dans un ballon bien sec et sous argon, le perchlorate d'argent (0,753 g – 3,635 mmol) et le tamis moléculaire en poudre (0,5g), pesés sous argon, sont mis en suspension dans 30 mL de CH₂Cl₂. La solution de **121** est introduite par canule sur cette suspension en 20 min à température ambiante et l'agitation est maintenue pendant 4h. La suspension est neutralisée par ajout de 1,0 mL de DIPEA et agitée pendant 10 min. puis filtrée sur célite. La solution obtenue est lavée par une solution

aqueuse de Na₂S₂O₃ (2x), par une solution aqueuse saturée en Na₂CO₃ (2x) puis par de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par flash chromatographie sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 20:80) pour donner un mélange d'anomères (ratio α/β = 71/29) du dérivé **122** (1,15 g – 2,63 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 88%

CCM : R_f = 0,63 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

$[\alpha]_D^{24} = +128,3$ (c 1,0 – CHCl₃)

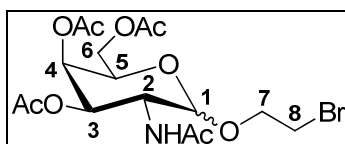
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 2968 ; 2930 (C_{sp3}-H, ν) ; 2114 (N=N=N, ν) ; 1752 (C=O ester, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₄H₂₀BrN₃O₈+Na]⁺ 460,0314 ; trouvé 460,0331 (-3,8 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *anomère α* : 2,03 ; 2,12 (CH₃ OAc) ; 3,52 (m, 2H, H_{8α}) ; 3,95 (m, 2H, H_{7α}) ; 3,65 (dd, 1H, $J_{H2\alpha-H1\alpha} = 3,6$ Hz, $J_{H2\alpha-H3\alpha} = 11,2$ Hz, H_{2α}) ; 4,10 (m, 2H, H_{6α}) ; 4,34 (td, 1H, $J_{H5\alpha-H4\alpha} = 0,6$ Hz, $J_{H5\alpha-H6\alpha/H6'\alpha} = 6,2$ Hz, H_{5α}) ; 5,04 (d, 1H, $J_{H1\alpha-H2\alpha} = 3,5$ Hz, H_{1α}) ; 5,35 (dd, $J_{H3\alpha-H4\alpha} = 3,3$ Hz, $J_{H3\alpha-H2\alpha} = 11,1$ Hz, H_{3α}) ; 5,45 (dd, 1H, $J_{H4\alpha-H5\alpha} = 0,7$ Hz, $J_{H4\alpha-H3\alpha} = 3,2$ Hz, H_{4α}) – *anomère β* : 2,03 ; 2,13 (CH₃ OAc) ; 3,52 (m, 2H, H_{8β}) ; 3,95 (m, 2H, H_{7β}) ; 3,85 (td, 1H, $J_{H5\beta-H4\beta} = 0,7$ Hz, $J_{H5\beta-H6\beta-H6'\beta} = 6,6$ Hz, H_{5β}) ; 4,10 (m, 3H, 2H_{6β}, H_{2β}) ; 4,42 (d, 1H, $J_{H1\beta-H2\beta} = 8,0$ Hz, H_{1β}) ; 4,75 (dd, 1H, $J_{H3\beta-H4\beta} = 3,4$ Hz, $J_{H3\beta-H2\beta} = 10,9$ Hz, H_{3β}) ; 5,31 (dd, 1H, $J_{H4\beta-H5\beta} = 0,5$ Hz, $J_{H4\beta-H3\beta} = 3,2$ Hz, H_{4β}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *anomère α* : 20,5 ; 20,6 (CH₃ OAc) ; 29,5 (C_{8α}) ; 57,2 (C_{2α}) ; 61,6 (C_{6α}) ; 67,1 (C_{5α}) ; 67,4 (C_{4α}) ; 68,0 (C_{3α}) ; 68,8 (C_{7α}) ; 98,3 (C_{1α}) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,3 (C=O OAc) – *anomère β* : 20,5 ; 20,6 (CH₃ OAc) ; 29,2 (C_{8β}) ; 60,7 (C_{2β}) ; 61,1 (C_{6β}) ; 66,2 (C_{4β}) ; 70,1 (C_{7β}) ; 70,8 (C_{5β}) ; 102,4 (C_{1β}) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,3 (C=O OAc).

2-Bromoéthyl-2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-deoxy-α/β-D-galactopyranoside (**123**)



C₁₆H₂₄BrNO₉

454,27 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution de glycoside **122** (0,236 g - 0,545 mmol) est traitée par de l'acide thioacétique (1,6mL – 22,4 mmol) à température ambiante pendant 48h.

L'acide thioacétique est évaporé sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 80:20) pour donner un mélange d'anomères ($\alpha/\beta = 70:30$) du dérivé **123** (0,191 g – 0,420 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 77%

CCM : Rf = 0,13 (AcOEt/Cyclohexane 80:20)

$[\alpha]_D^{24} = + 52,5$ (c 1,1 – CHCl₃)

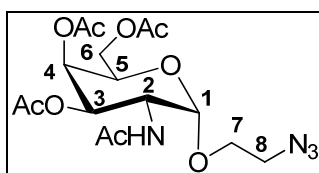
IR (pur) v (cm⁻¹) : 3367 (N-H, v) ; 2964 ; 2930 (Csp₃-H, v) ; 1746 (C=O ester, v) ; 1662 (C=O amide, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₆H₂₄BrNO₉+Na]⁺ 476,0528 ; trouvé 476,0532 (-0,9 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *anomère α* : 1,92 ; 1,93 ; 2,10 (3s, 12H, CH₃ OAc, NHAc) ; 3,49 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz, H_{8 α}) ; 3,75 (m, 1H, $J = 5,5$ Hz, $J = 11,5$ Hz, H_{7 α}) ; 3,78 (m, 1H, $J = 6,2$ Hz, $J = 13,2$ Hz, H_{7 α}) ; 4,02 (m, 2H, H_{6 α}) ; 4,21 (t, 1H, $J_{H5\alpha-H6\alpha/H6'\alpha} = 6,4$ Hz, H_{5 α}) ; 4,52 (m, 1H, $J_{H2\alpha-H1\alpha} = 3,7$ Hz, $J_{H2\alpha-NHAc} = 9,7$ Hz, $J_{H2\alpha-H3\alpha} = 11,3$ Hz, H_{2 α}) ; 4,88 (d, 1H, $J_{H1\alpha-H2\alpha} = 3,7$ Hz, H_{1 α}) ; 5,11 (dd, 1H, $J_{H3\alpha-H4\alpha} = 3,2$ Hz, $J_{H3\alpha-H2\alpha} = 11,4$ Hz, H_{3 α}) ; 5,33 (d, 1H, $J_{H4\alpha-H3\alpha} = 2,6$ Hz, H_{4 α}) ; 5,87 (d, 1H, $J_{NHAc-H2\alpha} = 9,5$ Hz, NHAc) – *anomère β* : 1,92 ; 1,93 ; 1,99 ; 2,08 (CH₃ OAc, NHAc) ; 3,43 (m, 2H, H_{8 β}) ; 3,85 (t, 1H, $J_{H5\beta-H6\beta-H6'\beta} = 7,2$ Hz, H_{5 β}) ; 3,90 – 4,06 (m, 5H, 2H_{6 β} , H_{2 β} , 2H_{7 β}) ; 4,72 (d, 1H, $J_{H1\beta-H2\beta} = 8,4$ Hz, H_{1 β}) ; 5,22 (dd, 1H, $J_{H3\beta-H4\beta} = 3,3$ Hz, $J_{H3\beta-H2\beta} = 11,2$ Hz, H_{3 β}) ; 5,30 (d, 1H, $J_{H4\beta-H3\beta} = 3,3$ Hz, H_{4 β}) ; 6,09 (d, 1H, $J_{NHAc-H2\beta} = 8,8$ Hz, NHAc).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *anomère α* : 20,5 ; 20,6 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 29,5 (C_{8 α}) ; 57,2 (C_{2 α}) ; 61,6 (C_{6 α}) ; 67,1 (C_{5 α}) ; 67,4 (C_{4 α}) ; 68,0 (C_{3 α}) ; 68,8 (C_{7 α}) ; 98,3 (C_{1 α}) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,3 (C=O OAc, C=O NHAc) – *anomère β* : 20,5 ; 20,6 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 29,2 (C_{8 β}) ; 60,7 (C_{2 β}) ; 61,1 (C_{6 β}) ; 66,2 (C_{4 β}) ; 70,1 (C_{7 β}) ; 70,8 (C_{5 β}) ; 102,4 (C_{1 β}) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,3 (C=O OAc, C=O NHAc).

2-azidoéthyl-3,4,6-tri-O-acétyl-N-acétyl- α -D-galactosamine (116)



416,38 g/mol

Un mélange de glycoside **123** (0,148 g – 0,326 mmol) et de NaN_3 (0,129 g – 1,987 mmol) dans 13 mL de DMF est chauffé à 60°C pendant 1h. Le DMF est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans CH_2Cl_2 puis lavé par H_2O (4x), séché sur MgSO_4 puis la phase organique est concentrée sous vide. Les deux anomères sont séparés par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 97:3) pour donner 76,2 mg (0,183 mmol) d'anomère α **116** (épitope Tn) et 28,3 mg (0,068 mmol) d'anomère β **124** sous forme de solides cristallisés incolores.

Rendement : 77%

CCM : $R_{f\text{anomère } \alpha} = 0,38$; $R_{f\text{anomère } \beta} = 0,34$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10)

PF : 95 – 97 °C

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3333 (N-H, ν) ; 2958 ; 2932 (Csp₃-H, ν) ; 2106 (N=N=N ; ν) ; 1748 (C=O ester, ν) ; 1647 (C=O amide, ν).

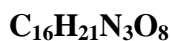
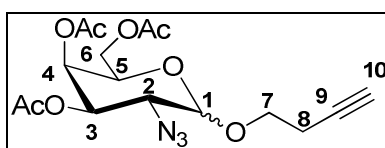
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_9 + \text{Na}]^+$ 439,1441 ; trouvé 439,1425 (-3,6 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : **anomère α** : 1,91 ; 1,94 ; 1,99 ; 2,10 (4s, 12H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 3,31 (ddd, 1H, $J_{\text{H}8\alpha\text{-H}7\alpha} = 2,8$ Hz, $J_{\text{H}8\alpha\text{-H}7'\alpha} = 5,4$ Hz, $J_{\text{H}8\alpha\text{-H}8'\alpha} = 13,4$ Hz, H_{8 α}) ; 3,48 (ddd, 1H, $J_{\text{H}8'\alpha\text{-H}7'\alpha} = 2,8$ Hz, $J_{\text{H}8'\alpha\text{-H}7\alpha} = 7,8$ Hz, $J_{\text{H}8'\alpha\text{-H}8\alpha} = 13,4$ Hz, H_{8' α}) ; 3,61 (ddd, 1H, $J_{\text{H}7\alpha\text{-H}8\alpha} = 2,8$ Hz, $J_{\text{H}7\alpha\text{-H}8'\alpha} = 7,8$ Hz, $J_{\text{H}7\alpha\text{-H}7'\alpha} = 10,7$ Hz, H_{7 α}) ; 3,86 (ddd, 1H, $J_{\text{H}7'\alpha\text{-H}8'\alpha} = 2,9$ Hz, $J_{\text{H}7'\alpha\text{-H}8\alpha} = 5,6$ Hz, $J_{\text{H}7'\alpha\text{-H}7\alpha} = 10,7$, H_{7' α}) ; 4,05 (m, 2H, H_{6 α}) ; 4,14 (t, 1H, $J_{\text{H}5\alpha\text{-H}6\alpha/\text{H}6'\alpha} = 6,5$ Hz, H_{5 α}) ; 4,55 (ddd, 1H, $J_{\text{H}2\alpha\text{-H}1\alpha} = 3,6$ Hz, $J_{\text{H}2\alpha\text{-NHAc}} = 9,6$ Hz, $J_{\text{H}2\alpha\text{-H}3\alpha} = 11,3$ Hz, H_{2 α}) ; 4,90 (d, 1H, $J_{\text{H}1\alpha\text{-H}2\alpha} = 3,6$ Hz, H_{1 α}) ; 5,11 (dd, $J_{\text{H}3\alpha\text{-H}4\alpha} = 3,2$ Hz, $J_{\text{H}3\alpha\text{-H}2\alpha} = 11,4$ Hz, H_{3 α}) ; 5,34 (d, 1H, $J_{\text{H}4\alpha\text{-H}3\alpha} = 2,6$ Hz, H_{4 α}) ; 5,75 (d, 1H, $J_{\text{NHAc-H}2\alpha} = 9,6$ Hz, NHAc) – **anomère β** : 1,95 ; 1,98 ; 2,03 ; 2,13 (4s, 12H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 3,26 (ddd, 1H, $J_{\text{H}8\beta\text{-H}7\beta} = 3,2$ Hz, $J_{\text{H}8\beta\text{-H}7'\beta} = 4,3$ Hz, $J_{\text{H}8\beta\text{-H}8'\beta} = 13,4$ Hz, H_{8 β}) ; 3,51 (ddd, 1H, $J_{\text{H}8'\beta\text{-H}7\beta} = 3,2$ Hz, $J_{\text{H}8'\beta\text{-H}7'\beta} = 8,6$ Hz, $J_{\text{H}8'\beta\text{-H}8\beta} = 11,7$ Hz, H_{8' β}) ; 3,70 (ddd, 1H, $J_{\text{H}7\beta\text{-H}8'\beta} = 3,1$ Hz, $J_{\text{H}7\beta\text{-H}8\beta} = 8,6$ Hz, $J_{\text{H}7\beta\text{-H}7'\beta} = 11,1$ Hz, H_{7 β}) ; 3,91 (m, 1H, H_{2 β}) ; 3,95 (dd, 1H, $J_{\text{H}5\beta\text{-H}6\beta} = 6,5$ Hz, $J_{\text{H}5\beta\text{-H}6'\beta} = 11,2$ Hz, H_{5 β}) ;

4,06 (ddd, 1H, $J_{H7'\beta-H8'\beta} = 3,4$ Hz, $J_{H7'\beta-H8'\beta} = 4,4$ Hz, $J_{H7'\beta-H7\beta} = 10,8$ Hz, $H7'\beta$) ; 4,85 (d, 1H, $J_{H1\beta-H2\beta} = 8,4$ Hz, $H1\beta$) ; 5,36 (m, 2H, $H3\beta$, $H4\beta$) ; 5,74 (d, 1H, $J_{NHAc-H2\beta} = 8,4$ Hz, $NHAc$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : anomère α : 20,6 (CH_3 OAc) ; 23,0 (CH_3 NHAc) ; 47,2 ($C_{2\alpha}$) ; 50,3 ($C_{8\alpha}$) ; 61,8 ($C_{6\alpha}$) ; 66,8 ($C_{5\alpha}$) ; 67,1 ($C_{4\alpha}$) ; 67,3 ($C_{7\alpha}$) ; 67,9 ($C_{3\alpha}$), 97,9 ($C_{1\alpha}$) ; 170,1 ; 170,2 ; 170,7 (C=O OAc, C=O NHAc) – **anomère β :** 20,7 (CH_3 OAc) ; 23,5 (CH_3 NHAc) ; 50,6 ($C_{8\beta}$) ; 51,8 ($C_{5\beta}$) ; 61,5 ($C_{6\beta}$) ; 66,8 ($C_{4\beta}$) ; 68,3 ($C_{7\beta}$) ; 69,6 ($C_{3\beta}$) ; 70,8 ($C_{2\beta}$) ; 100,6 ($C_{1\beta}$) ; 170,2 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,7 (C=O OAc, C=O NHAc).

Butynyl-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranoside (**125**)



383,35 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution de dérivé bromé **121** (1,17 g – 2,96 mmol) dans 30 mL de CH_2Cl_2 anhydre est traitée par du 3-butyn-1-ol (0,160 mL – 0,149 mmol) et par de la 2,4,6-collidine (0,470 mL – 3,60 mmol, distillée, stockée sur tamis moléculaire 4Å). Dans un ballon bien sec et sous argon, le perchlorate d'argent (0,747 g – 3,60 mmol) et le tamis moléculaire en poudre (0,5 g), pesés sous argon, sont mis en suspension dans 30 mL de CH_2Cl_2 . La solution de **121** est introduite par canule sur cette suspension en 20 min. à température ambiante et l'agitation est maintenue pendant 4h. La suspension est neutralisée par ajout de 1,0 mL de DIPEA et agitée pendant 10 min. puis filtrée sur célite. La solution obtenue est lavée par une solution aqueuse de $Na_2S_2O_3$ (2x), par une solution aqueuse saturée en Na_2CO_3 (2x) puis par de la saumure. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 40:60) pour donner un mélange d'anomères (ratio $\alpha/\beta = 65,4/34,6$) du dérivé **125** (0,919 g – 2,40 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 81%

CCM : $R_f = 0,30$ (AcOEt/Cyclohexane 30:70)

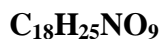
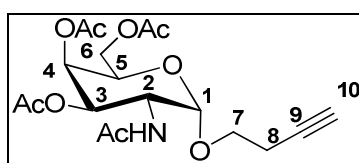
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3287 (C_{sp-H} , ν) ; 2964 ; 2941 ; 2889 (C_{sp^3-H} , ν) ; 2114 ($N=N=N$, ν) ; 1748 (C=O ester, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[C_{16}H_{21}N_3O_8+Na]^+$ 406,1219 ; trouvé 406,1226 (-1,8 ppm).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : anomère α : 2,01 ; 2,10 (s, 10H, CH_3 OAc, $H_{10\alpha}$) ; 2,52 (m, 2H, $2H_{8\alpha}$) ; 3,72 (m, 2H, $H_{2\alpha}$, $H_{7\alpha}$) ; 4,07 (m, 3H, $2H_{6\alpha}$, $H_{7\alpha}$) ; 4,29 (td, 1H, $J_{H5\alpha-H4\alpha} = 0,8$ Hz, $J_{H5\alpha-H6\alpha/H6'\alpha} = 7,0$ Hz, $H_{5\alpha}$) ; 5,02 (d, 1H, $J_{H1\alpha-H2\alpha} = 3,5$ Hz, $H_{1\alpha}$) ; 5,33 (dd, 1H, $J_{H3\alpha-H4\alpha} = 3,3$ Hz, $J_{H3\alpha-H2\alpha} = 11,1$ Hz, $H_{3\alpha}$) ; 5,42 (dd, 1H, $J_{H4\alpha-H5\alpha} = 1,2$ Hz, $J_{H4\alpha-H3\alpha} = 3,2$ Hz, $H_{4\alpha}$) – **anomère β :** 2,01 ; 2,10 (s, 10H, CH_3 OAc, $H_{10\beta}$) ; 2,52 (m, 2H, $H_{8\beta}$) ; 3,72 (m, 3H, $H_{2\beta}$, $H_{5\beta}$, $H_{7\beta}$) ; 4,07 (m, 3H, $2H_{6\beta}$, $H_{7\beta}$) ; 4,40 (d, 1H, $J_{H1\beta-H2\beta} = 3,5$ Hz, $H_{1\beta}$) ; 4,74 (dd, 1H, $J_{H3\beta-H4\beta} = 3,4$ Hz, $J_{H3\beta-H2\beta} = 10,9$ Hz, $H_{3\beta}$) ; 5,29 (dd, 1H, $J_{H4\beta-H5\beta} = 1,0$ Hz, $J_{H4\beta-H3\beta} = 3,4$ Hz, $H_{4\beta}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : anomère α : 19,6 ($C_{8\alpha}$) ; 20,5 (CH_3 OAc) ; 57,2 ($C_{2\alpha}$) ; 61,5 ($C_{6\alpha}$) ; 66,8 ($C_{7\alpha}$) ; 66,9 ($C_{5\alpha}$) ; 67,6 ($C_{4\alpha}$) ; 68,0 ($C_{3\alpha}$) ; 69,9 ($C_{10\alpha}$) ; 80,4 ($C_{9\alpha}$) ; 98,1 ($C_{1\alpha}$) ; 169,7 ; 170,0 ; 170,2 (C=O OAc) – **anomère β :** 19,8 ($C_{8\beta}$) ; 20,5 (CH_3 OAc) ; 60,6 ($C_{2\beta}$) ; 61,0 ($C_{6\beta}$) ; 66,2 ($C_{4\beta}$) ; 66,9 ($C_{5\beta}$) ; 68,3 ($C_{7\beta}$) ; 68,3 ($C_{6\beta}$) ; 69,8 ($C_{10\beta}$) ; 70,8 ($C_{3\beta}$) ; 80,1 ($C_{9\beta}$) ; 102,2 ($C_{1\beta}$) ; 169,7 ; 170,0 ; 170,2 (C=O OAc).

Butynyl-2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-deoxy- α -D-galactopyranoside (**117**)



399,39 g/mol

Sous atmosphère inerte, une solution de glycoside **125** (0,798 g – 2,082 mmol) est traitée par de l'acide thioacétique (6,1 mL – 0,085 mmol) à température ambiante pendant 48h. L'acide thioacétique est évaporé sous vide. Les deux anomères sont séparés par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 80:20) pour donner 0,207 g (0,518 mmol) d'anomère α (GalNAc) **117** et 0,257 g d'anomère β **126** (0,645 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 30% (α)

CCM : Rf = 0,30 (AcOEt/Cyclohexane 80:20)

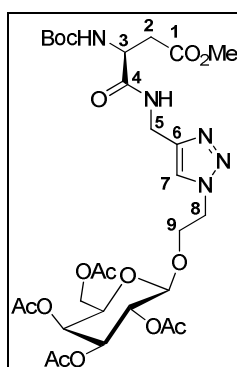
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3283 (N-H, ν) ; Csp-H, ν) ; 3084 (Csp-H, ν) ; 2956 ; 2930 (Csp $_3$ -H, ν) ; 2119 (C \equiv C-H, ν) ; 1746 (C=O ester, ν) ; 1662 (C=O amide).

HR-MS : m/z calculé pour $[C_{18}H_{25}NO_9+Na]^+$ 422,1427 ; trouvé 422,1416 (-2,6 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : anomère α : 1,90 ; 1,93 (2s, 6H, CH₃ OAc) ; 1,97 (t, 1H, $J_{H10-H8/H8'}$ = 2,6 Hz, H₁₀) ; 1,99 ; 2,10 (s, 6H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,45 (td, 2H, J_{H8-H10} = 2,5 Hz, J_{H8-H7} = 6,3 Hz, H_{8a}) ; 3,55 (dt, 1H, J_{H7-H8} = 6,4 Hz, $J_{H7-H7'}$ = 9,9 Hz, H₇) ; 3,75 (dt, 1H, $J_{H7'-H8}$ = 6,2 Hz, $J_{H7'-H7}$ = 9,9 Hz, H_{7'}) ; 4,00 (dd, 1H, J_{H6-H5} = 7,0 Hz, $J_{H6-H6'}$ = 11,3 Hz, H₆) ; 4,07 (dd, 1H, $J_{H6'-H5}$ = 6,0 Hz, $J_{H6'-H6}$ = 11,3 Hz, H_{6'}) ; 4,19 (t, 1H, J_{H5-H6} = 6,5 Hz, H₅) ; 4,52 (ddd, 1H, J_{H2-H1} = 3,7 Hz, J_{H2-NH} = 9,8 Hz, J_{H2-H3} = 11,2 Hz, H₂) ; 4,87 (d, 1H, J_{H1-H2} = 3,7 Hz, H₁) ; 5,11 (dd, 1H, J_{H3-H4} = 2,8 Hz, J_{H3-H2} = 11,3 Hz, H₃) ; 5,32 (d, 1H, J_{H4-H3} = 2,8 Hz, H₄), 5,80 (d, 1H, J_{NH-H2} = 9,6 Hz, NHAc)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : anomère α : 19,6 (C₈) ; 20,5 ; 20,6 ; 23,1 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 47,5 (C₂) ; 61,8 (C₆) ; 66,2 (C₇) ; 66,8 (C₅) ; 67,2 (C₄) ; 68,3 (C₃) ; 69,7 (C₈) ; 80,9 (C₇) ; 97,8 (C₁) ; 169,9 ; 170,18 ; 170,2 ; 170,7 (C=O OAc, C=O NHAc).

Monomère « propargylamide » glycosylé Gal(OAc) (**136**)



C₂₉H₄₃N₅O₁₅

701,68 g/mol

Le composé **136** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3 dipolaire en utilisant :

- Monomère **53** (0,078 g – 0,273 mmol)
- Sucre **134** (0,114 g – 0,273 mmol – 1,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,109 mL – 0,022 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,328 mL – 0,066 mmol)
- *t*BuOH/H₂O (2 : 1 – 1,0 mL)

Après 3 jours, le *t*BuOH est évaporé sous vide. Le milieu est extrait par CH₂Cl₂ (3x). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit

brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt) pour donner le composé **136** (0,102 g – 0,145 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 53%

CCM : Rf = 0,59 (AcOEt/MeOH 90:10)

PF : 70 – 72 °C

$[\alpha]_D^{23} = -0,6$ (c 0,535 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3362 ; 3333 (N-H, ν) ; 3150 (Csp₂-H, ν) ; 2980 ; 2955 ; 2938 (Csp₃-H, ν) ; 1745 (C=O ester, ν) ; 1674 (C=O amide, C=O carbamate, ν).

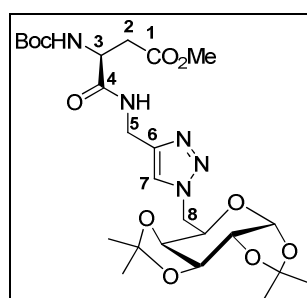
HR-MS : m/z calculé pour [C₂₉H₄₃N₅O₁₅+H]⁺ 702,2834 ; trouvé 702,2821 (-1,8 ppm).

HPLC : t_R = 8,3 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 1,92 ; 1,94 ; 2,01 ; 2,13 (4s, 12H, CH₃ OAc) ; 2,69 (dd, 1H, $J_{H2-H3} = 5,4$ Hz, $J_{H2-H2'} = 16,8$ Hz, H₂) ; 2,97 (dd, 1H, $J_{H2'-H3} = 4,3$ Hz, $J_{H2'-H2} = 16,8$ Hz, H_{2'}) ; 3,65 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,89 (m, 2H, H₉, H_{5su}) ; 4,07 (dd, 1H, $J_{H6su-H5su} = 6,6$ Hz, $J_{H6su-H5su} = 11,3$ Hz, H_{6su}) ; 4,12 (dd, 1H, $J_{H6'su-H5su} = 6,7$ Hz, $J_{H6'su-H6su} = 11,3$ Hz, H_{6'su}) ; 4,20 (dt, 1H, $J_{H9'-H8} = 4,0$ Hz, $J_{H9'-H9} = 10,5$ Hz, H_{9'}) ; 4,41 (d, 1H, $J_{H1su-H2su} = 7,9$ Hz, H_{1su}) ; 4,51 (m, 5H, H₃, 2H₅, 2H₈) ; 4,95 (dd, 1H, $J_{H3su-H4su} = 3,4$ Hz, $J_{H3su-H2su} = 10,5$ Hz, H_{3su}) ; 5,12 (dd, 1H, $J_{H2su-H1su} = 7,9$ Hz, $J_{H2su-H3su} = 10,5$ Hz, H_{2su}) ; 5,35 (dd, 1H, $J_{H4su-H5su} = 0,7$ Hz, $J_{H4su-H3su} = 3,3$ Hz, H_{4su}) ; 5,67 (d, 1H, $J_{NH-H3} = 7,8$ Hz, NH) ; 7,18 (t, 1H, $J_{NH'-H5/H5'} = 5,5$ Hz, NH') ; 7,53 (s, 1H, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,3 ; 20,4 (CH₃ OAc) ; 28,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,0 (C₅) ; 35,9 (C₂) ; 49,8 (C₈) ; 50,6 (C₃) ; 51,8 (CH₃ CO₂Me) ; 61,0 (C_{6su}) ; 66,8 (C_{4su}) ; 67,4 (C₉) ; 68,3 (C_{2su}) ; 70,4 (C_{3su}) ; 70,7 (C_{5su}) ; 80,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 100,7 (C_{1su}) ; 123,3 (C₇) ; 144,2 (C₆) ; 155,3 (C=O Boc) ; 169,4 ; 169,8 ; 170,0 (C=O OAc) ; 170,2 (C₁) ; 170,6 (C=O OAc) ; 171,9 (C₄).

Monomère « propargylamide » glycosylé (137)



569,60 g/mol

Le composé **137** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Monomère **53** (0,099 g – 0,351 mmol)
- Sucre **135** (0,100 g – 0,351 mmol – 1,0 éq.)
- CuSO_4 0,1M aq. (0,281 mL – 0,028 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,842 mL – 0,084 mmol)
- DMF (1,5 mL).

Après 6h, le DMF est évaporé sous vide et le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15) pour donner le composé **137** (0,175 g – 0,309 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 88%

CCM : $R_f = 0,59$ (AcOEt)

PF : 61 – 63 °C

$[\alpha]_D^{23} = -26,3$ (c 0,320 – CHCl_3)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3337 ; 3320 (N-H, ν) ; 3140 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2982 ; 2924 ; 2953 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1736 (C=O ester, ν) ; 1714 (C=O carbamate, ν) ; 1676 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{10}+\text{H}]^+$ 570,2775 ; trouvé 570,2755 (-3,5 ppm).

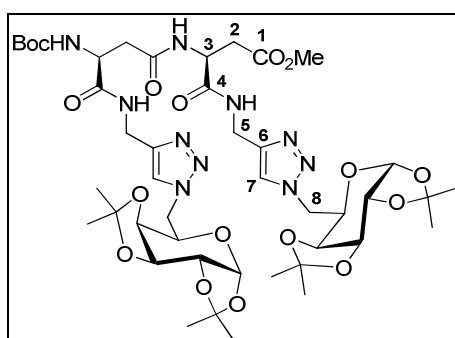
HPLC : $t_R = 15,9$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,27 ; 1,34 ; 1,38 ; 1,46 (s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène) ; 1,41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 2,68 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2\text{-H}_3} = 5,2$ Hz, $J_{\text{H}_2\text{-H}_2'} = 16,8$ Hz, H_2) ; 2,96 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2'\text{-H}_3} = 3,8$ Hz, $J_{\text{H}_2'\text{-H}_2} = 16,8$ Hz, H_2') ; 3,65 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 4,16 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, $\text{H}_{4\text{su}}$, $\text{H}_{5\text{su}}$) ; 4,30 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2\text{su-H}_3\text{su}} = 2,3$ Hz, $J_{\text{H}_2\text{su-H}_1\text{su}} = 4,7$ Hz, $\text{H}_{2\text{su}}$) ; 4,41 (dd, 1H, $J_{\text{H}_6\text{-su-H}_5\text{su}} = 8,4$ Hz, $J_{\text{H}_6\text{su-H}_6'\text{su}} = 14,0$ Hz, $\text{H}_{6\text{su}}$) ; 4,49 (m, 3H, H_3 , H_5 , $\text{H}_{6'\text{su}}$) ; 4,56

(dd, 1H, $J_{H5'-NH} = 3,5$ Hz, $J_{H5'-H5} = 14,3$ Hz, $H_{5'}$) ; 4,61 (dd, 1H, $J_{H3su-H2su} = 1,9$ Hz, $J_{H3su-H4su} = 7,6$ Hz, H_{3su}) ; 5,48 (d, 1H, $J_{H1su-H2su} = 4,9$ Hz, H_{1su}) ; 5,65 (d, 1H, $J_{NH-H5/H5'} = 7,3$ Hz, NH) ; 7,11 (se, 1H, NH') ; 7,66 (se, 1H, H_7).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 24,4 ; 24,9 ; 25,9 ($C(CH_3)_2$ isopropylidène) ; 28,3 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 35,2 (C_5) ; 35,9 (C_2) ; 50,6 (C_{6su}) ; 50,7 (C_3) ; 52,0 (CH_3 CO_2Me) ; 67,1 (C_{4su}) ; 70,3 (C_{2su}) ; 70,7 (C_{3su}) ; 71,1 (C_{5su}) ; 80,6 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 96,2 (C_{1su}) ; 109,1 ; 109,9 ($2C(CH_3)_2$ isopropylidène) ; 155,5 ($C=O$ Boc) ; 170,7 (C_1) ; 172,2 (C_4).

Dimère « propargylamide » glycosylé (**138**)



$C_{44}H_{66}N_{10}O_{17}$

1007,05 g/mol

Le composé **138** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Dimère **60** (0,072 g – 0,166 mmol)
- Sucre **135** (0,094 g – 0,331 mmol – 2,0 éq.)
- $CuSO_4$ 0,1M aq. (0,266 mL – 0,027 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,796 mL – 0,080 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (1,0 mL).

Après 2 jours, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH_2Cl_2 , est lavé par H_2O (4x) puis par de la saumure. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($AcOEt/MeOH$ 97:3) pour donner le composé **138** (0,109 g – 0,108 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 65%

CCM : Rf = 0,62 (AcOEt/MeOH 90:10)

PF : 124 – 127 °C

$[\alpha]_D^{24} = -40,5$ (*c* 0,555 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3312 ; 3277 (N-H, ν) ; 3144 ; 3084 (Csp²-H, ν) ; 2985 ; 2933 (Csp³-H, ν) ; 1737 (C=O ester, ν) ; 1688 (C=O carbamate, ν) ; 1658 ; 1643 (C=O amide, ν).

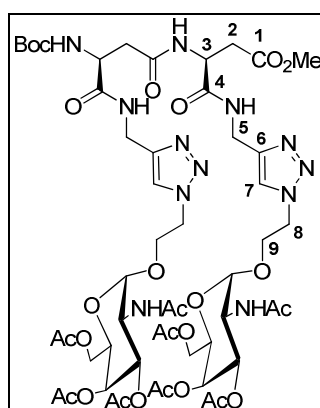
HR-MS : m/z calculé pour [C₄₄H₆₆N₁₀O₁₇+H]⁺ 1007,4686 ; trouvé 1007,4679 (-0,7 ppm).

HPLC : t_R = 31,9 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,25 ; 1,26 ; 1,35 ; 1,36 ; 1,47 ; 1,54 ; 1,56 (6s, 24H, C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 3,01 (m, 2H, H_{2A}, H_{2B}) ; 3,16 (dd, 1H, $J_{H2'A-H3A} = 7,9$ Hz, $J_{H2'A-H2A} = 13,9$ Hz, H_{2'A}) ; 3,29 (dd, 1H, $J_{H2'B-H3B} = 5,8$ Hz, $J_{H2'B-H2B} = 16,0$ Hz, H_{2'B}) ; 3,54 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,29 (dd, 1H, $J_{H5su-H4su} = 0,98$ Hz, $J_{H5su-H6su} = 7,9$ Hz, H_{5su}) ; 4,35 (d, 1H, $J_{H5su-H6su} = 7,6$ Hz, H_{5su}) ; 4,50 (m, 2H, H_{2su}) ; 4,57 (m, 2H, H_{4su}) ; 4,76 (m, 10H, 4H₅, 2H_{3su}, 4H_{6su}) ; 5,29 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,55 (m, 1H, H_{3B}) ; 5,67 (m, 2H, H_{1su}) ; 8,18 ; 8,19 (2s, 2H, H₇) ; 8,30 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,3$ Hz, NH_A) ; 9,46 (t, 1H, $J_{NH'-H3} = 4,2$ Hz, NH') ; 9,67 (t, 1H, $J_{NH'-H3} = 4,6$ Hz, NH') ; 9,75 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 8,4$ Hz, NH_B).

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 24,7 ; 25,3 ; 26,4 ; 26,5 (C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 28,6 (C(CH₃)₃ Boc) ; 36,0 ; 36,1 (2C₅) ; 37,3 (C_{2B}) ; 39,6 (C_{2A}) ; 51,1 (C_{3B} 2C_{6su}) ; 51,9 (CH₃ CO₂Me) ; 53,2 (C_{3A}) ; 67,9 ; 68,0 (2C_{4su}) ; 71,2 (2C_{2su}) ; 71,5 (2C_{3su}) ; 71,9 (2C_{5su}) ; 79,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 97,0 (2C_{1su}) ; 109,3 ; 110,0 (4C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 124,5 ; 124,6 (2C₇) ; 146,3 ; 146,5 (2C₆) ; 156,9 (C=O Boc) ; 171,5 ; 171,7 (2C₁) ; 172,0 ; 173,0 (2C₄).

Dimère « propargylamide » glycosylé GalNAc (**139**)



1269,23 g/mol

Le composé **139** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3 dipolaire en utilisant :

- Dimère **60** (0,030 g – 0,069 mmol)
- Sucre **116** (0,057 g – 0,137 mmol – 2,0 éq.)
- CuSO_4 0,1M aq. (0,110 mL – 0,011 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,330 mL – 0,033 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (0,716 mL).

Après 18h, le DMF est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans CH_2Cl_2 est lavé 4 fois par H_2O . La phase aqueuse est contre-extraite par CH_2Cl_2 . Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 93:7) pour donner le composé **139** (0,068 g – 0,054 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 78%

CCM : Rf = 0,2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 93 : 7)

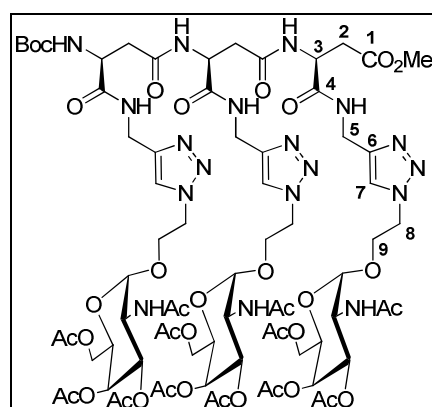
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{52}\text{H}_{76}\text{N}_{12}\text{O}_{25}+\text{H}]^+$ 1269,5137 ; trouvé 1269,5123 (1,1 ppm).

RMN ^1H (400 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm): 1,40 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 2,00 ; 2,01 ; 2,01 ; 2,02 ; 2,03 ; 2,21 ; 2,26 (s, 24H, CH_3 OAc, CH_3 NHAc) ; 3,02 – 3,14 (m, 2H, $\text{H}_{2\text{A}}$, $\text{H}_{2\text{B}}$) ; 3,31 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2'\text{A}}-\text{H}_{3\text{A}}} = 9,3$ Hz, $J_{\text{H}_{2'\text{A}}-\text{H}_{2\text{A}}} = 13,6$ Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$) ; 3,29 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{2'\text{B}}-\text{H}_{3\text{B}}} = 5,1$ Hz, $J_{\text{H}_{2'\text{B}}-\text{H}_{2\text{B}}} = 16,2$ Hz, $\text{H}_{2'\text{B}}$) ; 3,52 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 3,94 – 4,08 (m, 2H, H_9) ; 4,14 – 4,55 (m, 8H, $2\text{H}_{5\text{su}}$, $4\text{H}_{6\text{su}}$, $2\text{H}_{9'}$) ; 4,55 – 4,86 (m, 7H, 3H_5 , 4H_8) ; 5,00 (dd, 1H, $J_{\text{H}_5-\text{NH}} = 6,3$ Hz, $J_{\text{H}_5-\text{H}_5'} =$

15,3 Hz, 1H₅) ; 5,06 – 5,17 (m, 2H, 2H_{2su}) ; 5,35 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,38 (d, 1H, $J_{H1su-H2su} = 3,3$ Hz, 1H_{1su}) ; 5,41 (m, 1H, H_{3B}) ; 5,44 (d, 1H, $J_{H1su-H2su} = 3,2$ Hz, 1H_{1su}) ; 5,59 (dd, 1H, $J_{H3su-H4su} = 3,1$ Hz, $J_{H3su-H2su} = 11,7$ Hz, 1H_{3su}) ; 5,76 (dd, 1H, $J_{H3su-H4su} = 2,1$ Hz, $J_{H3su-H2su} = 12,1$ Hz, 1H_{3su}) ; 5,80 (d, 1H, $J_{H4su-H3su} = 2,6$ Hz, 1H_{4su}) ; 5,88 (d, 1H, $J_{H4su-H3su} = 1,6$ Hz, 1H_{4su}) ; 8,06 (s, 1H, 1H₇) ; 8,19 (s, 1H, 1H₇) ; 8,39 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,6$ Hz, NH_A) ; 9,28 (m, 1H, 1NH') ; 9,65 (m, 1H, 1NH') ; 9,84 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 7,6$ Hz, NH_B).

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm): 20,9 ; 21,0 ; 21,1 ; 21,1 (CH₃ OAc) ; 23,6 ; 23,6 (CH₃ NHAc) ; 28,8 (C(CH₃)₃ Boc) ; 36,1 ; 36,5 (2C₅) ; 37,0 (C_{2B}) ; 39,9 (C_{2A}) ; 48,7 ; 48,8 (2C_{2su}) ; 50,1 ; 50,3 (2C₈) ; 51,8 (C_{3B}) ; 52,1 (CH₃ CO₂Me) ; 53,3 (C_{3A}) ; 62,8 ; 63,0 (2C_{6su}) ; 66,9 ; 67,3 (2C₉) ; 67,9 (2C_{5su}) ; 68,5 ; 69,7 (2C_{4su}) ; 69,2 ; 69,3 (2C_{3su}) ; 79,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 98,5 ; 99,0 (2C_{1su}) ; 123,8 (2C₇) ; 146,3 ; 147,0 (2C₆) ; 156,9 (C=O Boc) ; 170,9 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,3 ; 171,4 (C=O OAc, C=O NHAc) ; 171,9 (1C₄) ; 172,1 ; 172,3 (2C₁) ; 173,8 (1C₄).

Trimère « propargylamide » glycosylé GalNAc (140)



C₇₅H₁₀₈N₁₈O₃₆

1837,76 g/mol

Le composé **140** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3 dipolaire en utilisant :

- Trimère **62** (0,014 g – 0,024 mmol)
- Sucre **116** (0,030 g – 0,072 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,038 mL – 0,004 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,120 mL – 0,011 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (0,250 mL).

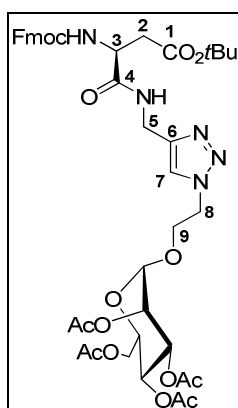
Après 18h, le DMF est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans CH₂Cl₂ est lavé 4 fois par H₂O. La phase aqueuse est contre-extraite par CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. On obtient 24,3 mg (0,013 mmol) de produit brut dont la purification n'a pas été tentée.

Rendement : brut 55%

CCM : R_f = 0,20 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

HR-MS : m/z calculé pour [C₇₅H₁₀₈N₁₈O₃₆+H]⁺ 1837,7252 ; trouvé 1837,7258 (0,3 ppm).

Monomère « propargylamide » glycosylé Man(OAc) (**141**)



C₄₂H₅₁N₅O₁₅

865,88 g/mol

Le composé **141** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Monomère **67** (0,100 g – 0,223 mmol)
- Sucre **114** (0,093 g – 0,223 mmol – 1,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,357 mL – 0,036 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (1,07 mL – 0,107 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (3 mL)

Après 3h30 de réaction, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95 :5) pour donner le composé **141** (0,158 g – 0,183 mmol) sous forme d'une huile incolore.

Rendement : 82%

CCM : Rf = 0,33 (CH₂Cl₂MeOH 95:5)

PF : 77 – 80 °C

$[\alpha]_D^{24} = + 25,8$ (c 0,515 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3377 ; 3348 (N-H, ν) ; 3142 (Csp₂-H, ν) ; 2980 ; 2956 ; 2889 (Csp₃-H, ν) ; 1746 (C=O ester, ν) ; 1678 (C=O amide, C=O carbamate, ν).

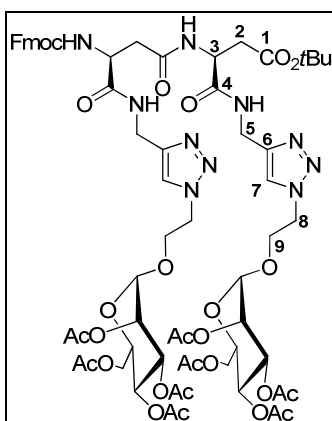
HR-MS : m/z calculé pour [C₄₂H₅₁N₅O₁₅+H]⁺ 866,3460 ; trouvé 866,3461 (+0,1 ppm).

HPLC : t_R = 14,5 min (H₂O/MeOH 20:80)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,98 ; 2,03 ; 2,08 ; 2,11 (4s, 12H, CH₃ OAc) ; 2,69 (dd, 1H, $J_{H2-H3} = 5,7$ Hz, $J_{H2-H2'} = 16,7$ Hz, H₂) ; 2,84 (dd, 1H, $J_{H2'-H3} = 5,5$ Hz, $J_{H2'-H2} = 16,7$ Hz, H_{2'}) ; 3,53 (m, 1H, H_{5su}) ; 3,84 (m, 1H, H₉) ; 4,03 (dd, 1H, $J_{H9'-H8} = 2,1$ Hz, $J_{H9'-H9} = 12,3$ Hz, H_{9'}) ; 4,17 (m, 2H, 2H_{6su}) ; 4,20 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, CH Fmoc) ; 4,41 (m, 2H, CH₂ Fmoc) ; 4,49 (m, 2H, 2H₈) ; 4,56 (m, 2H, 2H₅) ; 4,57 (m, 1H, H₃) ; 4,70 (se, 1H, H_{1su}) ; 5,13 (se, 1H, H_{2su}) ; 5,13 (m, 1H, H_{3su}) ; 5,20 (m, 1H, H_{4su}) ; 6,02 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, NH) ; 7,18 (m, 1H, NH') ; 7,30 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,39 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,52 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,62 (s, 1H, H₇) ; 7,75 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, H_{Ar} Fmoc).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 ; 21,0 (CH₃ OAc) ; 28,0 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 35,3 (C₅) ; 37,4 (C₂) ; 47,1 (CH Fmoc) ; 49,6 (C₈) ; 51,3 (C₃) ; 62,1 (C_{6su}) ; 65,7 (C_{4su}) ; 66,1 (C₉) ; 67,1 (CH₂ Fmoc) ; 68,8 (C_{3su}) ; 69,0 (C_{5su}) ; 69,2 (C_{2su}) ; 81,6 (C(CH₃)₃ ester) ; 97,4 (C_{1su}) ; 120,0 (CH_{Ar} Fmoc) ; 123,3 (C₇) ; 125,0 ; 127,0 ; 127,7 (CH_{Ar} Fmoc) ; 141,2 ; 143,6 (C_{Ar} Fmoc) ; 145,0 (C₆) ; 156,0 (C=O Fmoc), 169,6 – 170,1 (C=O OAc) ; 170,3 (C₁) ; 170,5 ; 170,6 (C=O OAc) ; 170,7 (C₄).

Dimère « propargylamide » glycosylé Man(OAc) (**142**)



$C_{65}H_{82}N_{10}O_{27}$

1435,40 g/mol

Le composé **142** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Dimère **70** (0,100 g – 0,166 mmol)
- Sucre **114** (0,140 g – 0,333 mmol – 2,0 éq.)
- $CuSO_4$ 0,1M aq. (1,60 mL – 0,166 mmol – 1,0 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (5,0 mL – 0,50 mmol – 3,0 éq.)
- DMF (10 mL)

Le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH_2Cl_2 , est lavé par H_2O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ de 95:5 à 90:10) pour donner le composé **142** (0,176 g – 0,123 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 74%

CCM : $R_f = 0,30$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 92:8)

PF : 116 – 119 °C

$[\alpha]_D^{24} = +14,2$ (c 0,585 – $CHCl_3$)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3304 ; 3295 (N-H, ν) ; 3082 (C_{sp^2} -H, ν) ; 2982 ; 2943 (C_{sp^3} -H, ν) ; 1748 ($C=O$ ester, ν) ; 1659 ($C=O$ amide, $C=O$ carbamate, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[C_{65}H_{82}N_{10}O_{27}+2H]^{2+}$ 718,2748 ; trouvé 718,2753 (-0,7 ppm).

HPLC : $t_R = 13,5$ min ($H_2O/MeOH$ 20:80).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, $C(CH_3)_3$ CO_2tBu) ; 1,97 ; 1,99 ; 2,02 ; 2,03 ; 2,07 2,08 ; 2,09 (s, 24H, CH_3 OAc) ; 2,62 (dd, 1H, $J_{H2A-H3A} = 3,7$ Hz, $J_{H2A-H2'A} = 14,5$

Hz, H_{2A}) ; 2,72 (m, 1H, H_{2'A}) ; 2,74 (dd, 1H, $J_{H_{2B}-H_{3B}} = 5,4$ Hz, $J_{H_{2B}-H_{2'B}} = 16,6$ Hz, H_{2B}) ; 2,84 (dd, 1H, $J_{H_{2'B}-H_{3B}} = 6,1$ Hz, $J_{H_{2'B}-H_{2B}} = 16,6$ Hz, H_{2'B}) ; 3,59 (m, 1H, H_{5su}) ; 3,65 (m, 1H, H_{5su}) ; 3,82 (m, 2H, H_{9A}, H_{9B}) ; 4,05 (m, 4H, H_{9'A}, H_{9'B}, H_{6suA}, H_{6suB}) ; 4,17 (m, 1H, CH Fmoc) ; 4,19 (dd, 2H, $J_{H_{6'su}-H_{5su}} = 5,1$ Hz, $J_{H_{6'suA/B}-H_{6suA/B}} = 12,5$ Hz, H_{6'suA}, H_{6'suB}) ; 4,40 (m, 2H, CH₂ Fmoc) ; 4,35 4,46 (m, 3H, 3H₅) ; 4,52 4,46 (m, 4H, 4H₈) ; 4,64 (dd, 1H, $J_{H_{5'A/B}-NH'A/B} = 6,3$ Hz, $J_{H_{5'}-H_5} = 15,4$ Hz, 1H_{5'}) ; 4,71 (m, 2H, H_{3A}, 1H_{1su}) ; 4,76 (s, 1H, 1H_{1su}) ; 4,83 (m, 1H, H_{3B}) ; 5,16 (m, 1H, 1H_{2su}) ; 5,20 (m, 2H, 2H_{3su}) ; 5,24 (m, 3H, 2H_{4su}, 1H_{2su}) ; 6,29 (d, 1H, $J_{NH_A-H_{3A}} = 8,4$ Hz, NH_A) ; 7,28 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,38 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,43 (m, 2H, NH_B 1NH') ; 7,55 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,56 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,68 (s, 1H, 1H₇) ; 7,69 (s, 1H, 1H₇) ; 7,74 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, H_{Ar} Fmoc) ; 7,85 (m, 1H, 1NH').

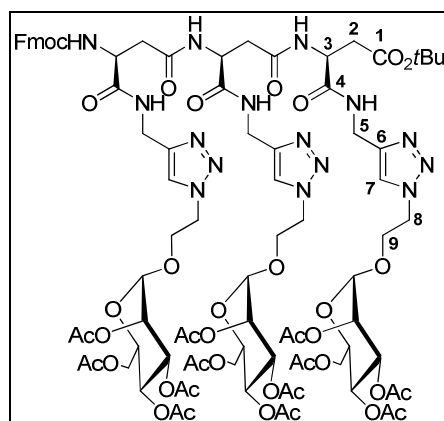
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 ; 20,9 (CH₃ OAc) ; 28,0 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 35,2 ; 35,3 (2C₅) ; 36,9 (C_{2B}) ; 38,1 (C_{2A}) ; 47,1 (CH Fmoc) ; 49,5 (2C₈) ; 49,6 (C_{3B}) ; 51,5 (C_{3A}) ; 62,2 (2C_{6su}) ; 65,4 ; 65,7 (2C_{4su}) ; 66,1 ; 66,2 (2C₉) ; 66,9 (CH₂ Fmoc) ; 68,8 ; 68,9 ; 69,0 ; 69,1 ; 69,3 (2C_{2su}, 2C_{3su}, 2C_{5su}) ; 81,3 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 97,4 ; 97,5 (2C_{1su}) ; 120,0 (CH_{Ar} Fmoc) ; 123,3 ; 123,6 (2C₇) ; 124,9 ; 127,0 ; 127,7 (CH_{Ar} Fmoc) ; 141,2 ; 143,6 (C_{Ar} Fmoc) ; 144,8 ; 145,6 (2C₆) ; 156,1 (C=O Fmoc) ; 169,6 ; 170,2 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,8 ; 171,3 ; 171,4 (2C₁, 2C₄, C=O OAc).

RMN ¹H (500 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 1,99 ; 2,04 ; 2,08 ; 2,10 (s, 24H, CH₃ OAc) ; 2,93 (dd, 1H, $J_{H_{2B}-H_{3B}} = 8,5$ Hz, $J_{H_{2B}-H_{2'B}} = 15,9$ Hz, H_{2B}) ; 3,02 (dd, 1H, $J_{H_{2A}-H_{3A}} = 4,8$ Hz, $J_{H_{2A}-H_{2'A}} = 14,0$ Hz, H_{2A}) ; 3,30 (m, 1H, H_{2'A}) ; 3,33 (dd, 1H, $J_{H_{2'B}-H_{3B}} = 5,6$ Hz, $J_{H_{2'B}-H_{2B}} = 16,0$ Hz, H_{2'B}) ; 3,98 (m, 4H, 2H_{5su}, 2H₉) ; 4,16 (m, 1H, CH Fmoc) ; 4,23 (m, 2H, 2H₉) ; 4,34 (dd, 1H, $J = 7,4$ Hz, $J = 10,5$ Hz, CH₂ Fmoc) ; 4,42 (m, 2H, 2H_{6su}) ; 4,55 (m, 3H, 2H_{6'su}, CH₂ Fmoc) ; 4,66 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, 2H₈) ; 4,72 (t, 2H, $J = 4,7$ Hz, 2H₈) ; 4,80 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, 2H₅) ; 4,82 (dd, 1H, $J_{H_5-NH'} = 5,1$ Hz, $J_{H_5-H_5'} = 15,5$ Hz, 1H₅) ; 4,90 (dd, 1H, $J_{H_{5'}-NH'} = 5,1$ Hz, $J_{H_{5'}-H_5} = 15,5$ Hz, H_{5'}) ; 5,11 (s, 1H, 1H_{1su}) ; 5,13 (s, 1H, 1H_{1su}) ; 5,50 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,57 (m, 1H, H_{3B}) ; 5,67 (m, 4H, 2H_{2su}, 2H_{3su}) ; 5,77 (m, 2H, 2H_{4su}) ; 7,25 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,40 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,84 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 8,15 (s, 1H, 1H₇) ; 8,25 (s, 1H, 1H₇) ; 9,15 (d, 1H, $J_{NH_A-H_{3A}} = 8,5$ Hz, NH_A) ; 9,38 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz, 1NH') ; 9,67 (d, 1H, $J_{NH_B-H_{3B}} = 8,5$ Hz, NH_B) ; 9,74 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, 1NH').

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 20,9 ; 21,0 ; 21,1 (CH₃ OAc) ; 28,4 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 36,1 ; 36,3 (2C₅) ; 38,8 (C_{2A}) ; 39,9 (C_{2B}) ; 48,1 (CH Fmoc) ; 50,1 (2C₈) ; 51,4 (C_{3B}) ; 53,6 (C_{3A}) ; 63,1 (2C_{6su}) ; 66,7 ; 66,8 (2C_{3su}, 2C_{4su}) ; 67,1 ; 67,2 (2C₉, CH₂ Fmoc) ; 69,9 (2C_{5su}) ; 70,27 ; 70,3 (2C_{2su}, C_{3su}) ; 98,3 ; 98,4 (2C_{1su}) ; 120,8 (CH_{Ar} Fmoc) ; 124,5 ;

124,7 (2C_{7A}) ; 126,1 ; 127,9 ; 128,5 (CH_{Ar} Fmoc) ; 142,1 ; 145,0 (C_{Ar} Fmoc) ; 146,2 ; 146,4 (2C_{6B}) ; 146,9 (C_{Ar} Fmoc) ; 155,4 (C=O Fmoc) ; 170,56 ; 170,6 ; 170,7 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,5 ; 172,1 (2C₁, 2C₄, C=O OAc).

Trimère « propargylamide » glycosylé Man(OAc) (**143**)



C₈₈H₁₁₃N₁₅O₃₉

2004,92 g/mol

Le composé **143** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Trimère **73** (0,038 g – 0,050 mmol)
- Sucre 114 (0,063 g – 0,151 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,500 mL – 0,050 mmol – 1,0 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (1,51 mL – 0,500 mmol – 3,0 éq.)
- DMF (10 mL)

Le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) pour donner le composé **143** (0,070 g – 0,035 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 70%

CCM : R_f = 0,41 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 132 – 135 °C

[α]_D²⁵ = + 18,0 (c 0,450 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3298 ; 3285 (N-H, ν) ; 3130 ; 3072 (Csp_2 -H, ν) ; 2967 ; 2940 (Csp_3 -H, ν) ; 1748 (C=O ester, ν) ; 1693 (C=O carbamate, ν) ; 1643 (C=O amide, ν).

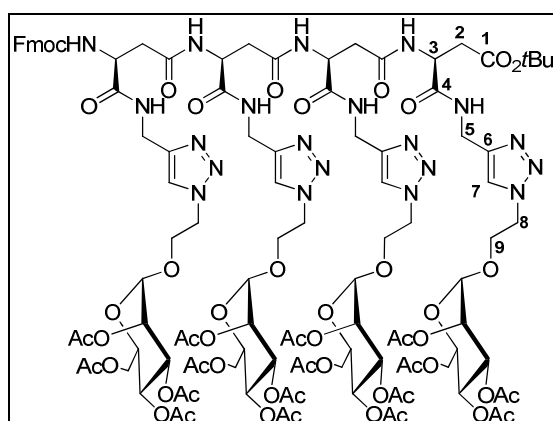
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{88}\text{H}_{113}\text{N}_{15}\text{O}_{39}+\text{H}]^+$ 1002,8733 ; trouvé 1002,8732 (0,1 ppm).

HPLC : $t_R = 11,8$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 20:80)

RMN ^1H (500 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 1,99 ; 2,03 ; 2,08 ; 2,08 ; 2,10 (s, 36H, $\text{CH}_3 \text{OAc}$) ; 2,92 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 8,1$ Hz, $J_{\text{H}_2-\text{H}_2'} = 15,8$ Hz, H_2) ; 2,95 (m, 1H, H_2) ; 2,97 (m, 1H, $\text{H}_{2\text{A}}$) ; 3,18 (m, 1H, $\text{H}_{2'\text{A}}$) ; 3,20 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$) ; 3,33 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$) ; 4,02 (m, 3H, $\text{H}_{5\text{su}}$) ; 4,04 (m, 3H, H_9) ; 4,17 (m, 1H, CH Fmoc) ; 4,26 (m, 4H, 3 H_9 , CH_2 Fmoc) ; 4,42 (m, 3H, $\text{H}_{6\text{su}}$) ; 4,55 (m, 4H, 3 $\text{H}_{6'\text{su}}$, CH_2 Fmoc) ; 4,68 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz, H_8) ; 4,76 (m, 4H, H_8) ; 4,81 (m, 3H, H_5) ; 4,94 (m, 3H, $\text{H}_{5'}$) ; 5,12 5,14 5,17 (s, 3H, $\text{H}_{1\text{su}}$) ; 5,43 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{A}}$) ; 5,55 (m, 1H, H_3) ; 5,68 (m, 6H, 3 $\text{H}_{2\text{su}}$, 3 $\text{H}_{3\text{su}}$) ; 5,77 (m, 4H, H_3 , 3 $\text{H}_{4\text{su}}$) ; 7,26 (m, 2H, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,40 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,60 (m, 2H, 2 H_{Ar} Fmoc) ; 7,84 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 8,19 ; 8,32 ; 8,34 (3s, 3H, H_7) ; 9,07 (d, 1H, $J_{\text{NH}_A-\text{H}_{3\text{A}}} = 8,4$ Hz, NH_A) ; 9,40 (m, 2H, 2 NH') ; 9,59 (d, 1H, $J_{\text{NH}-\text{H}_3} = 8,5$ Hz, NH) ; 9,72 (d, 1H, $J_{\text{NH}-\text{H}_3} = 8,0$ Hz, NH) ; 9,73 (m, 1H, NH').

RMN ^{13}C (100 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm) : 20,9 ; 21,0 ; 21,2 ($\text{CH}_3 \text{OAc}$) ; 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 36,2 ; 36,3 (3 C_5) ; 48,0 (CH Fmoc) ; 50,1 (3 C_8) ; 51,5 ; 51,6 (2 C_3) ; 53,6 ($\text{C}_{3\text{A}}$) ; 63,1 (3 $\text{C}_{6\text{su}}$) ; 66,8 (3 $\text{C}_{4\text{su}}$) ; 67,1 ; 67,2 (3 C_9 , CH_2 Fmoc) ; 69,9 (3 $\text{C}_{5\text{su}}$) ; 70,29 ; 70,34 ; 70,4 (3 $\text{C}_{2\text{su}}$, 3 $\text{C}_{3\text{su}}$) ; 81,1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 98,4 (3 $\text{C}_{1\text{su}}$) ; 120,9 (CH_{Ar} Fmoc) ; 126,1 ; 126,2 (3 C_7) ; 128,0 ; 128,5 (CH_{Ar} Fmoc) ; 142,1 (C_{Ar} Fmoc) ; 145,0 ; 146,4 ; 146,5 ; 147,0 (3 C_6 , C_{Ar} Fmoc) ; 155,8 (C=O Fmoc) ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,7 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,5 ; 173,1 (3 C_1 , 3 C_4 , C=O OAc).

Tétramère « propargylamide » glycosylé Man(OAc) (**144**)



2558,44 g/mol

Le composé **144** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Tétramère **94** (0,070 g – 0,077 mmol)
- Sucre **114** (0,129 g – 0,309 mmol – 4,0 éq.)
- CuSO_4 0,1M aq. (0,774 mL – 0,077 mmol – 1,0 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (2,32 mL – 0,232 mmol – 3,0 éq.)
- DMF (10 mL)

Le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH_2Cl_2 , est lavé 4 fois par H_2O puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) pour donner le composé **144** (0,157 g – 0,062 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 80%

CCM : $R_f = 0,88$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 80:20)

PF : 162 – 164 °C

$[\alpha]_D^{25} = +20,7$ (c 0,570 – CHCl_3)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3300 (N-H, ν) ; 3144 ; 3078 ; 3063 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2947 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1748 (C=O ester, ν) ; 1647 (C=O carbamate, C=O amide, ν).

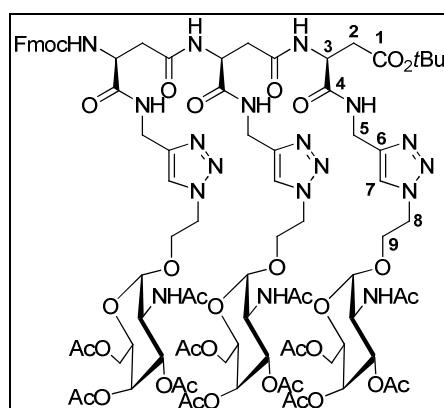
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{111}\text{H}_{144}\text{N}_{20}\text{O}_{50}+\text{H}]^+$ 1287,47 ; trouvé 1287,4717 (0,98 ppm).

HPLC : $t_R = 10,7$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 20 :80)

RMN ¹H (400 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,97 ; 1,99 ; 2,00 ; 2,03 ; 2,08 ; 2,08 ; 2,10 (s, 48H, CH₃ OAc) ; 2,92 (dd, 1H, $J_{H2D-H3D} = 8,6$ Hz, $J_{H2D-H2'D} = 15,6$ Hz, H_{2D}) ; 2,95 (m, 3H, H_{2A}, H_{2B}, H_{2C}) ; 3,09 (dd, 1H, $J_{H2'-H3} = 8,6$ Hz, $J_{H2'-H2} = 13,9$ Hz, H_{2'}) ; 3,19 (m, 2H, H_{2'A}, H₂) ; 3,31 (dd, 1H, $J_{H2'D-H3D} = 5,2$ Hz, $J_{H2'D-H2D} = 15,6$ Hz, H_{2'D}) ; 4,02 (m, 8H, 4H_{5su}, 4H₉) ; 4,25 (m, 6H, 4H_{9'}, CH Fmoc, CH₂ Fmoc) ; 4,42 (m, 4H, H_{6su}) ; 4,55 (td, 5H, $J = 4,9$ Hz, $J = 12,3$ Hz, 4H_{6'su}, CH₂ Fmoc) ; 4,77 – 4,94 (m, 16H, 8H₅, 8H₈) ; 5,12 ; 5,13 ; 5,18 (s, 4H, H_{1su}) ; 5,41 (m, 1H, H_{3A}) ; 5,54 (m, 1H, H_{3D}) ; 5,67 – 5,76 (m, 14H, 2H₃, 4H_{2su}, 4H_{3su}, 4H_{4su}) ; 7,26 (m, 2H, 2HAr Fmoc) ; 7,40 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, 2HAr Fmoc) ; 7,61 (m, 2H, 2HAr Fmoc) ; 7,83 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, 2HAr Fmoc) ; 8,40 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, 2HAr Fmoc) ; 8,08 ; 8,20 ; 8,30 ; 8,39 (s, 4H, 4H₇) ; 9,04 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,5$ Hz, NH_A) ; 9,43 (m, 3H, 3NH') ; 9,56 (d, 1H, $J_{NHD-H3D} = 8,4$ Hz, NH_D) ; 9,63 (m, 2H, NH_B, NH_C) ; 9,71 (t, 1H, $J = 5,1$ Hz, 1NH').

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 20,9 ; 21,1 ; 21,2 (CH₃ OAc) ; 28,4 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 36,2 ; 36,3 (4C₅) ; 38,8 (C_{2D}) ; 39,5 ; 39,6 ; 39,9 (3C₂) ; 48,1 (CH Fmoc) ; 50,1 (4C₈) ; 51,5 (C_{3D}) ; 51,6 ; 51,6 (2C₃) ; 53,7 (C_{3A}) ; 63,1 (4C_{6su}) ; 66,8 (4C_{4su}) ; 67,2 (4C₉, CH₂ Fmoc) ; 69,8 ; 70,3 ; 70,4 (4C_{2su}, 4C_{3su}, 4C_{5su}) ; 81,1 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 98,4 (4C_{1su}) ; 124,0 ; 125,1 (4C₇) ; 120,9 ; 126,1 ; 128,0 ; 128,6 (CHAr Fmoc) ; 142,1 ; 145,0 ; 146,4 ; 146,5 ; 146,9 (4C₆, CAr Fmoc) ; 157,6 (C=O Fmoc) ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,5 ; 171,6 ; 172,1 ; 173,1 ; 173,3 (4C₁, 4C₄, C=O OAc).

Trimère « propargylamide » glycosylé GalNAc (**146**)



2001,96 g/mol

Le composé **146** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Trimère **73** (0,060 g – 0,080 mmol)
- Sucre **116** (0,100 g – 0,240 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,801 mL – 0,080 mmol – 1,0 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (2,40 mL – 0,240 mmol – 3,0 éq.)
- DMF (2 mL dilué à 10 mL)

Le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 90:10 à 80:20) pour donner le composé **146** (0,116 g – 0,058 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 73%

CCM : R_f = 0,50 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 140 – 143 °C

$[\alpha]_D^{25} = +43,9$ (c 0,570 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3323 (N-H, ν) ; 3070 (Csp₂-H, ν) ; 2949 (Csp₃-H, ν) ; 1744 (C=O ester, ν) ; 1659 (C=O amide, C=O carbamate, ν).

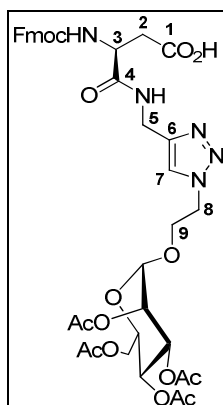
HR-MS : m/z calculé pour [C₈₈H₁₁₆N₁₈O₃₆+2H]²⁺ 1001,3973; trouvé 1001,3970 (+0,3 ppm).

HPLC : t_R = 27,5 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (500 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,96 ; 1,98 ; 2,00 ; 2,01 2,20 ; 2,23 ; 2,28 (s, 36H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,94 (dd, 1H, $J_{H2C-H3C} = 8,8$ Hz, $J_{H2C-H2'C} = 16,0$ Hz, H_{2C}) ; 2,95 (m, 1H, H_{2A}) ; 3,02 (dd, 1H, $J_{H2B-H3B} = 4,0$ Hz, $J_{H2B-H2'B} = 13,6$ Hz, H_{2B}) ; 3,16 (m, 1H, $J_{H2'B-H3B} = 9,8$ Hz, $J_{H2'B-H2B} = 13,9$ Hz, H_{2'B}) ; 3,19 (dd, 1H, $J_{H2'A-H3A} = 10,2$ Hz, $J_{H2'A-H2A} = 13,7$ Hz, H_{2'A}) ; 3,28 (dd, 1H, $J_{H2'C-H3C} = 4,7$ Hz, $J_{H2'C-H2C} = 16,0$ Hz, H_{2'C}) ; 3,95 (m, 1H, 1H₉) ; 4,05 (m, 2H, 2H₉) ; 4,13 (t, 1H, $J_{CH-CH2} = 6,8$ Hz, CH Fmoc) ; 4,39 (m, 14H, 6H_{6su}, 3H_{5su}, CH₂ Fmoc, 3H₉) ; 4,70 (m, 11H, 5H₅, 6H₈) ; 5,12 (m, 4H, 3H_{2su}, H₅) ; 5,40 (m, 3H, 3H_{1su}, H_{3A}, H_{3C}) ; 5,62 (dd, 1H, $J_{H3su-H4su} = 3,1$ Hz, $J_{H3su-H2su} = 11,8$ Hz, H_{3su}) ; 5,66 (m, 1H, H_{3B}) ; 5,72 (dt, 2H, $J_{H3su-H4su} = 3,6$ Hz, $J_{H3su-H2su} = 10,8$ Hz, 2H_{3su}) ; 5,80 (d, 1H, $J_{H4su-H3su} = 2,9$ Hz, H_{4su}) ; 5,85 (d, 1H, $J_{H4su-H3su} = 2,9$ Hz, H_{4su}) ; 5,87 (d, 1H, $J_{H4su-H3su} = 2,5$ Hz, H_{4su}) ; 7,25 (m, 2H, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,38 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,58 (m, 2H, CH_{Ar} Fmoc) ; 7,82 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_{Ar} Fmoc) ; 8,14 ; 8,20 ; 8,24 (s, 3H, 3H₇) ; 8,77 (m, 3H, NHAc) ; 9,17 (d, 1H, $J_{NHA-H3A} = 8,4$ Hz, NH_A) ; 9,28 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH') ; 9,37 (t, 1H, $J = 4,5$ Hz, NH') ; 9,77 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, NH') ; 9,98 (d, 1H, $J_{NHC-H3C} = 7,2$ Hz, NH_C) ; 9,99 (d, 1H, $J_{NHB-H3B} = 7,7$ Hz, NH_B).

RMN ¹³C (100 MHz, Pyridine-d₅) δ (ppm) : 21,0 ; 21,2 ; 21,3 ; 23,7 ; 23,8 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 28,5 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 36,22 ; 36,25 ; 36,6 (3C₅) ; 38,6 (C_{2C}) ; 39,5 ; 40,3 (C_{2A}, C_{2B}) ; 48,1 (CH Fmoc) ; 48,8 ; 48,9 (3C_{2su}) ; 50,3 ; 50,5 (3C₈) ; 52,2 (C_{3B}) ; 52,5 (C_{3A}) ; 53,9 (C_{3C}) ; 62,9 ; 63,0 (3C_{6su}) ; 66,9 ; 67,2 ; 67,4 (3C₉) ; 67,6 (CH₂ Fmoc) ; 67,88 ; 67,95 ; 68,0 (3C_{5su}) ; 68,6 ; 68,66 ; 69,71 (3C_{4su}) ; 69,3 ; 69,35 ; 69,4 (3C_{3su}) ; 81,4 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 98,5 ; 98,7 ; 99,1 (3C_{1su}) ; 121,0 ; 126,2 ; 126,3 ; 128,1 ; 128,7 (CH_{Ar} Fmoc) ; 124,6 (3C₇) ; 142,2 ; 145,1 (C_{Ar} Fmoc) ; 146,5 ; 146,6 ; 147,3 (3C₆) ; 157,8 (C=O Fmoc) ; 171,0 ; 171,07 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,5 ; 172,0 ; 172,1 ; 172,3 ; 173,5 ; 173,7 (3C₁, 3C₄, C=O OAc, C=O NHAc).

Monomère « propargylamide » acide glycosylé (148)



809,77 g/mol

Le composé **148** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'acide protégé sous forme de CO_2tBu en utilisant :

- Composé **141** (0,100 g – 0,115 mmol)
- TFA/ CH_2Cl_2 (2 mL)

On obtient le composé **148** (0,093 g – 0,115 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : $R_f = 0,16$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10)

$$[\alpha]_D^{25} = +23,5 \text{ (c } 0,630 - \text{CHCl}_3\text{)}$$

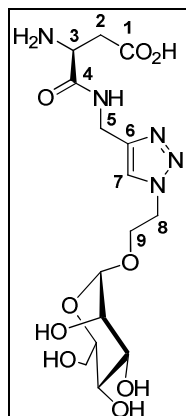
IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3348 (O-H, N-H, ν) ; 3140 ; 3063 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2941 ; 2893 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1743 ; 1730 (C=O acide, C=O ester, ν) ; 1678 (C=O carbamate, ν) ; 1665 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_{15}+\text{H}]^+$ 810,2834 ; trouvé 810,2819 (-1,8 ppm).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,98 ; 2,03 ; 2,08 ; 2,11 (s, 12H, CH_3 OAc) ; 2,77 (m, 1H, H_2) ; 2,99 (m, 1H, H_2) ; 3,67 (m, 1H, $\text{H}_{5\text{su}}$) ; 3,85 (m, 1H, H_9) ; 4,12 (m, 4H, H_9 , $2\text{H}_{6\text{su}}$, CH Fmoc) ; 4,55 (m, 8H, H_3 , 2H_8 , 2H_5 , CH_2 Fmoc, $\text{H}_{1\text{su}}$) ; 5,21 (m, 3H, $\text{H}_{2\text{su}}$, $\text{H}_{3\text{su}}$, $\text{H}_{4\text{su}}$) ; 6,25 (se, 1H, NH) ; 7,28 ; 7,37 ; 7,56 ; 7,73 (m, 10H, H_{Ar} Fmoc, H_7 , NH').

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 ; 20,8 (CH_3 OAc) ; 34,5 (C_5) ; 36,2 (C_2) ; 47,0 (CH Fmoc) ; 50,6 (C_8) ; 51,1 (C_3) ; 62,4 ($\text{C}_{6\text{su}}$) ; 65,7 ($\text{C}_{4\text{su}}$) ; 65,9 (C_9) ; 67,4 (CH_2 Fmoc) ; 68,99 ; 69,0 ; 69,2 ($\text{C}_{2\text{su}}$, $\text{C}_{3\text{su}}$, $\text{C}_{5\text{su}}$) ; 97,5 ($\text{C}_{1\text{su}}$) ; 120,0 ; 125,0 ; 127,1 ; 127,8 (CH_{Ar} Fmoc, C_7) ; 141,2 ; 143,5 ; 143,6 (C_{Ar} Fmoc, C_6) ; 156,2 (C=O Fmoc) ; 169,8 ; 170,5 ; 170,9 ; 171,7 ; 173,5 (C_1 , C_4 , C=O OAc).

Monomère « propargylamide » glycosylé Man(OH) (**150**)



C₁₅H₂₅N₅O₉
419,39 g/mol

Le composé **141** est traité selon la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- **141** (0,100 g – 0,116 mmol)
- Et₂NH/CH₃CN (1:2 – 4,3 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) pour donner l'amine libre **151** avec un rendement de 97%.

L'amine **151** (0,032 g – 0,050 mmol) est ensuite déprotégée quantitativement en présence de 1 mL de TFA/CH₂Cl₂ (1:1) pour obtenir l'aminoacide correspondant **151a**.

Une solution de **151a** (0,030 g – 0,050 mmol) dans 2 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL – *qsp* pH = 8) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **150** (0,044 g – 0,106 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 97% (3 étapes)

CCM : R_f = 0,54 (n-propanol/H₂O 70:30)

$[\alpha]_D^{21} = + 22,8$ (c 0,270 – H₂O)

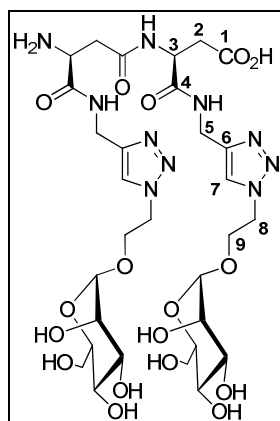
HR-MS : m/z calculé pour [C₁₅H₂₅N₅O₉+H]⁺ 420,1731 ; trouvé 420,1721 (-2,3 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 2,84 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 8,4 Hz, J_{H2-H2'} = 17,8 Hz, H₂) ; 2,96 (dd, 1H, J_{H2'-H3} = 4,5 Hz, J_{H2'-H2} = 17,7 Hz, H_{2'}) ; 3,05 (m, 1H, H_{5su}) ; 3,58 (d, 2H, J = 6,3 Hz, H_{3su}, H_{4su}) ; 3,63 (dd, 1H, J_{H6su-H5su} = 5,8 Hz, J_{H6su-H6'su} = 11,9 Hz, H_{6su}) ; 3,74 (m,

2H, H_{2su}, H_{6'su}) ; 3,83 (m, 1H, H₉) ; 4,09 (m, 1H, H_{9'}) ; 4,17 (dd, 1H, $J_{H3-H2'} = 4,7$ Hz, $J_{H3-H2} = 8,2$ Hz, H₃) ; 4,51 (dd, 1H, $J_{H5-NH} = 4,48$ Hz, $J_{H5-H5'} = 15,3$ Hz, H₅) ; 4,54 (d, 1H, $J_{H5'-H5} = 15,4$ Hz, H_{5'}) ; 4,61 (t, 2H, $J_{H8-H9} = 4,6$ Hz, 2H₈) ; 4,69 (s, 1H, H_{1su}) ; 7,93 (s, 1H, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 35,9 (C₂, C₅) ; 51,4 (C₃, C₈) ; 62,8 (C_{6su}) ; 66,7 (C₉) ; 68,5 (C_{su}) ; 71,9 (C_{2su}) ; 72,4 (C_{su}) ; 74,5 (C_{5su}) ; 101,6 (C_{1su}) ; 125,4 (C₇) ; 145,5 (C₆) ; 169,4 ; 173,4 (C₁, C₄).

Dimère « propargylamide » glycosylé Man(OH) (155)



C₃₀H₄₈N₁₀O₁₇

820,76 g/mol

Le composé **142** est traité selon la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- **142** (0,100 g – 0,069 mmol)
- Et₂NH/CH₃CN (1:2 – 5,2 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) pour donner l'amine libre **154** avec un rendement de 91%.

L'amine **154** (0,076 g – 0,063 mmol) est ensuite déprotégée quantitativement en présence de 2 mL de TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1) pour obtenir l'acide correspondant **154a**.

Une solution de **154a** (0,072 g – 0,063 mmol) dans 1 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL – *qsp* pH = 8) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **155** (0,051 g – 0,063 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 91% (3 étapes)

CCM : Rf = 0,5 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 142 – 145 °C

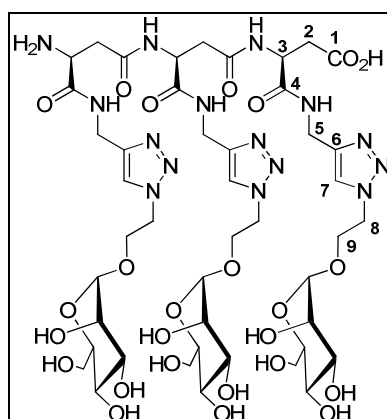
$[\alpha]_D^{21} = -19,1$ (c 0,220 – H₂O)

HR-MS : m/z calculé pour [C₃₀H₄₈N₁₀O₁₇+H]⁺ 821,325 ; trouvé 821,3272 (2,65 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 2,57 (dd, 1H, $J_{H2-H3} = 8,6$ Hz, $J_{H2-H2'} = 16,0$ Hz, H₂) ; 2,67 (dd, 1H, $J_{H2'-H3} = 5,0$ Hz, $J_{H2'-H2} = 15,9$ Hz, H_{2'}) ; 2,75 (m, 1H, H₂) ; 2,79 (dd, 1H, $J_{H2'-H3} = 6,1$ Hz, $J_{H2'-H2} = 15,5$ Hz, H_{2'}) ; 2,95 (m, 1H, $J = 2,2$ Hz, $J = 5,7$ Hz, H_{5su}) ; 3,00 (m, 1H, $J = 2,0$ Hz, $J = 5,5$ Hz, H_{5su}) ; 3,54 3,69 (m, 6H, 2H_{3su}, 2H_{4su}, 2H_{6su}) ; 3,73 (dd, 1H, $J_{H6'su-H5su} = 2,2$ Hz, $J_{H6'su-H6su} = 12,2$ Hz, H_{6'su}) ; 3,74 (dd, 1H, $J_{H6'su-H5su} = 2,3$ Hz, $J_{H6'su-H6su} = 12,2$ Hz, H_{6'su}) ; 3,85 (m, 2H, 2H_{2su}) ; 3,87 3,94 (m, 2H, 2H₉) ; 3,96 (m, 1H, H₃) ; 4,01 4,12 (m, 2H, 2H_{9'}) ; 4,47 (d, 4H, $J = 4,1$ Hz, 4H₅) ; 4,54 – 4,69 (m, 5H, H₃, 4H₈) ; 4,79 (m, 2H, 2H_{1su}) ; 7,92 ; 7,96 (2s, 2H, 2H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 34,5 ; 34,6 (2C₅) ; 38,7 (2C₂) ; 50,0 (2C₈) ; 51,2 ; 51,8 (2C₃) ; 60,6 (2C_{6su}) ; 65,2 ; 65,4 (2C₉) ; 66,4 ; 66,4 (2C_{su}) ; 69,9 (2C_{2su}) ; 70,4 ; 70,4 (2C_{su}) ; 72,7 (2C_{5su}) ; 99,4 ; 99,5 (2C_{1su}) ; 124,4 ; 124,5 (2C₇) ; 144,4 ; 144,7 (2C₆) ; 171,8 ; 173,5 ; 177,5 (2C₁, 2C₄).

Trimère « propargylamide » glycosylé Man(OH) (157)



C₄₅H₇₁N₁₅O₂₅

1222,13 g/mol

Le composé **143** est traité selon la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- **143** (0,050 g – 0,025 mmol)

- Et₂NH/CH₃CN (1:2 – 0,930 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 95:5 à 90:10) pour donner l'amine libre **156** avec un rendement de 84%.

L'amine **156** (0,038 g – 0,022 mmol) est ensuite déprotégée quantitativement en présence de 2 mL de TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1) pour obtenir l'acide correspondant **156a**.

Une solution de **156a** (0,038 g – 0,022 mmol) dans 1 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL – *qsp* pH = 8) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **157** (0,028 g – 0,022 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 84% (3 étapes)

CCM : R_f = 0,47 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 139 – 141 °C

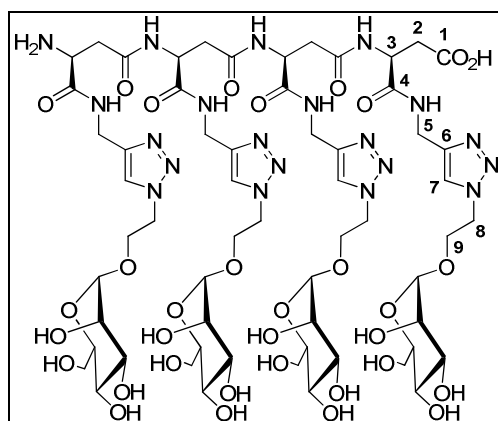
$[\alpha]_D^{21} = + 18,9$ (c 0,220 – H₂O)

HR-MS : m/z calculé pour [C₄₅H₇₁N₁₅O₂₅+2H]²⁺ 611,745 ; trouvé 611,7446 (-1,63 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 2,67 (dd, 1H, *J*_{H2-H3} = 7,8 Hz, *J*_{H2-H2'} = 15,4 Hz, H₂) ; 2,78 – 2,91 (m, 3H, H₂) ; 2,91 – 3,06 (m, 5H, 2H₂, 3H_{5su}) ; 3,53 – 3,68 (m, 9H, 3H_{3su}, 3H_{4su}, 3H_{6su}) ; 3,68 – 3,77 (m, 3H, H_{6'su}) ; 3,84 (m, 3H, H_{2su}) ; 3,89 (m, 3H, H₉) ; 4,01 – 4,12 (m, 3H, H_{9'}) ; 4,35 (dd, 1H, *J* = 5,7 Hz, *J* = 7,0 Hz, H₃) ; 4,43 ; 4,46 ; 4,49 (s, 6H, H₅) ; 4,58 – 4,67 (m, 6H, H₈) ; 4,71 (m, 2H, H₃) ; 4,77 (m, 3H, H_{1su}) ; 7,91 ; 7,92 ; 7,96 (3s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 34,5 ; 34,6 (3C₅) ; 35,3 ; 35,5 ; 36,8 (3C₂) ; 49,8 ; 50,4 (3C₃) ; 50,1 (3C₈) ; 60,7 (3C_{6su}) ; 65,4 (3C₉) ; 66,4 (3C_{su}) ; 67,9 (3C_{2su}) ; 70,4 (3C_{su}) ; 72,7 (3C_{5su}) ; 99,5 (3C_{1su}) ; 124,5 ; 124,6 (3C₇) ; 143,9 ; 144,5 ; 144,5 (3C₆) ; 168,4 ; 170,0 ; 171,7 ; 172,1 ; 172,3 ; 174,0 (3C₁, 3C₄).

Tétramère « propargylamide » glycosylé Man(OH) (159)



1623,50 g/mol

Le composé **144** est traité selon la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- **144** (0,100 g – 0,039 mmol)
- Et₂NH/CH₃CN (1:2 – 1,4 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 95:5 à 90:10) pour donner l'amine libre **158** avec un rendement de 72%.

L'amine **158** (0,065 g – 0,028 mmol) est ensuite déprotégée quantitativement en présence de 2 mL de TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1) pour obtenir l'acide correspondant **158a**.

Une solution de **158a** (0,64 g – 0,028 mmol) dans 1 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL – *qsp* pH = 8) pendant 2h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **159** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 72% (3 étapes)

CCM : R_f = 0,10 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 127 – 130 °C

$[\alpha]_D^{21} = -10,3$ (c 0,310 – H₂O)

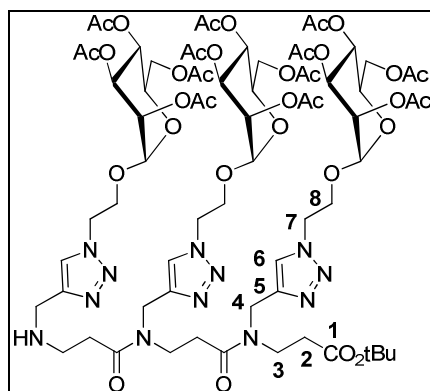
HR-MS : m/z calculé pour [C₆₀H₉₄N₂₀O₃₃+2H]²⁺ 833,328 ; trouvé 833,3272 (-0,52 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 2,63 – 2,76 (m, 2H, H₂) ; 2,78 – 2,91 (m, 2H, H₂) ; 2,91 – 3,03 (m, 8H, 4H₂, 4H_{5su}) ; 3,53 – 3,68 (m, 12H, 4H_{3su}, 4H_{4su}, 4H_{6su}) ; 3,67 – 3,76 (m, 4H, 4H_{6'su}) ; 3,85 (m, 4H, H_{2su}) ; 3,89 (m, 4H, H₉) ; 3,96 – 4,15 (m, 5H, 4H₉, H₃) ; 4,35 (t, 1H, J

= 7,0 Hz, H₃) ; 4,42 ; 4,46 ; 4,49 (s, 8H, H₅) ; 4,55 ; 4,67 (m, 8H, H₈) ; 4,72 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz, H₃) ; 4,76 (m, 4H, H_{1su}) ; 7,91 ; 7,92 ; 7,98 (s, 4H, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 34,6 ; 34,7 (4C₅) ; 35,3 ; 36,8 (4C₂) ; 49,8 ; 50,2 ; 50,4 ; 50,5 (4C₃) ; 50,1 (4C₈) ; 60,7 (4C_{6su}) ; 65,4 (4C₉) ; 66,4 (4C_{su}) ; 69,9 (4C_{2su}) ; 70,4 (4C_{su}) ; 72,7 (4C_{5su}) ; 99,5 (4C_{1su}) ; 124,5 ; 124,5 ; 124,6 ; 124,7 (4C₇) ; 144,7 (4C₆) ; 168,4 ; 170,0 ; 171,6 ; 171,8 ; 172,1 ; 172,3 ; 173,9 ; 174,0 (4C₁, 4C₄).

Trimère « peptoïde » glycosylé (**161**)



C₇₀H₁₀₀N₁₂O₃₄

1653,60 g/mol

Le composé **161** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Trimère linéaire **160** (0,100 g – 0,249 mmol)
- Sucre **114** (0,312 g – 0,748 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,400 mL – 0,040 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (1,200 mL – 0,120 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (1,3 mL).

Après 18h, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé par H₂O (4x). La phase aqueuse est contre-extraite par CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) pour donner le composé **161** (0,259 g – 0,016 mmol) sous la forme d'un solide.

Rendement : 63%

CCM : Rf = 0,36 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 81 – 84 °C

$[\alpha]_D^{22} = + 30,6$ (c 0,520 – MeOH)

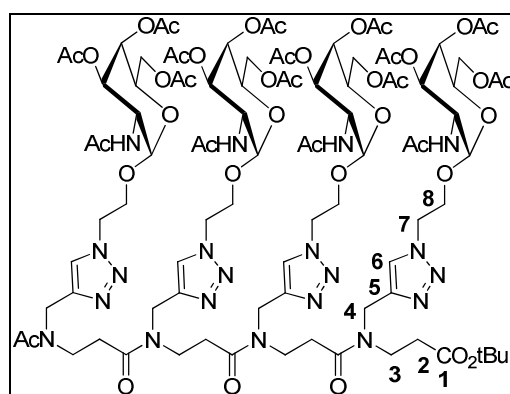
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3125 (Csp₂-H, ν) ; 2959 (Csp₃-H, ν) ; 1746 (C=O ester, ν) ; 1640 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₇₀H₁₀₀N₁₂O₃₄+2H]²⁺ 827,3305 ; trouvé 827,3321 (-1,9 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 1,95 ; 2,01 ; 2,02 ; 2,06 ; 2,10 (s, 36H, CH₃ OAc) ; 2,80 (m, 6H, 6H₂) ; 3,60 (m, 6H, 3H_{5su}, 3H_{6su}) ; 4,03 (m, 15H, 3H_{6'su}, 6H₈, 6H₃) ; 4,55 (m, 12H, 6H₇, 6H₄) ; 4,77 (s, 3H, 3H_{1su}) ; 5,18 (m, 9H, 3H_{2su}, 3H_{3su}, 3H_{4su}) ; 7,66 7,85 (m, 3H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 (CH₃ OAc) ; 27,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 31,5 ; 33,7 ; 34,3 ; 34,5 (CH₂) ; 40,4 ; 40,5 ; 42,4 ; 43,4 (CH₂) ; 49,4 ; 49,6 (CH₂) ; 62,1 (C_{6su}) ; 65,5 (C_{4su}) ; 66,1 (CH₂) ; 68,7 ; 68,8 ; 68,9 ; 69,0 (3C_{2su}, 3C_{3su}, 3C_{5su}) ; 80,5 ; 81,0 ; 81,1 (C(CH₃)₃ Boc) ; 97,36 ; 97,4 (3C_{1su}) ; 123,3 ; 124,3 (3C₆) ; 143,7 ; 144,0 ; 144,2 (3C₅) ; 169,5 ; 169,7 ; 169,8 ; 170,2 ; 170,5 ; 171,1 (3C₁, C=O OAc).

Tétramère « peptoïde » linéaire glycosylé GalNAc (**163**)



C₉₄H₁₃₆N₂₀O₄₂

2218,19 g/mol

Le composé **163** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3 dipolaire en utilisant :

- Tétramère linéaire **162** (0,020 g – 0,026 mmol)
- Sucre **116** (0,060 g – 0,145 mmol – 4,0 éq.)

- CuSO₄ 0,1M aq. (0,076 mL – 0,007 mmol – 0,21 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,230 mL – 0,023 mmol – 0,64 éq.)
- DMF (0,378 mL).

Après 18h, le DMF est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans CH₂Cl₂ est lavé 4 fois par H₂O. La phase aqueuse est contre-extraite par CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée NaCl, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 90:10 à 85:15) pour donner le composé **163** (0,034 g – 0,016 mmol) sous forme de solide blanc.

Rendement : 60%

CCM : R_f = 0,58 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

PF : 116 – 118 °C

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3140 (Csp₂-H, ν) ; 2956 ; 2924 ; 2855 (Csp₃-H, ν) ; 1744 (C=O ester, ν) ; 1640 (C=O amide, ν).

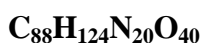
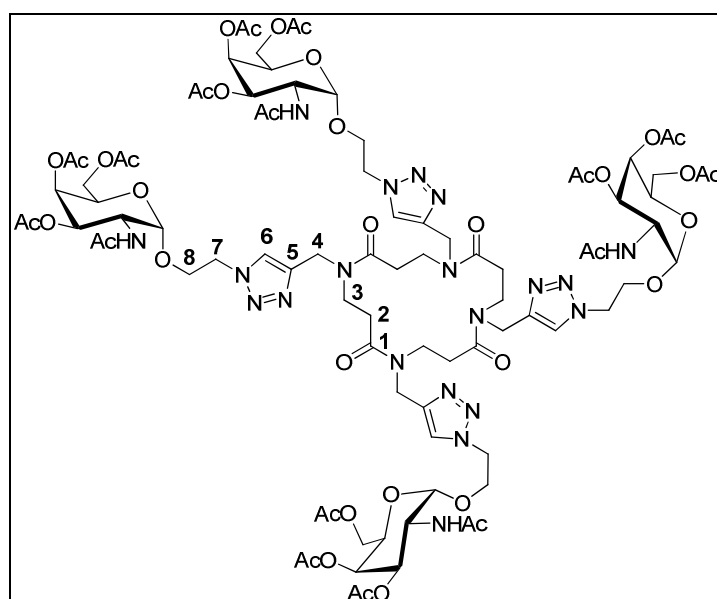
HR-MS : m/z calculé pour [C₉₄H₁₃₆N₂₀O₄₂+2H]²⁺ 1109,4639 ; trouvé 1109,4601 (3,4 ppm).

HPLC : t_R = 6,1 min (H₂O/MeCN 70:30)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 1,96 ; 2,04 ; 2,14 (s, 51H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc, CH₃ NAc) ; 2,69 (m, 8H, H₂) ; 3,86 (m, 28H, 8H₇, 8H₈, 8H_{6su}, 4H_{5su}) ; 4,57 (m, 20H, 8H₄, 8H₃, 4H_{2su}) ; 4,91 (m, 4H, H_{1su}) ; 5,07 (m, 4H, H_{3su}) ; 5,36 (m, 4H, H_{4su}) ; 6,53 (m, 4H, NHAc) ; 7,75 (m, 4H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,7 ; 23,1 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc, CH₃ NAc) ; 28,1 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 31,8 (4C₂) ; 34,5 (4C₄, 4C₃) ; 47,5 (4C_{2su}) ; 50,0 (4C₇) ; 62,0 (4C_{6su}) ; 66,6 (4C₈) ; 67,1 ; 67,2 ; 67,8 ; 67,9 ; 68,1 ; 68,2 (2C_{3su}, 4C_{4su}, 4C_{5su}) ; 98,0 (4C_{1su}) ; 128,8 ; 130,9 (4C₆) ; 170,4 ; 170,5 ; 170,7 ; 170,8 (4C₁, C=O OAc, C=O NHAc).

Tétramère « peptoïde » cyclique glycosylé GalNAc (166)



2102,04 g/mol

Le composé **166** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Tétramère cyclique **164** (0,020 g – 0,046 mmol)
- Sucre **116** (0,076 g – 0,183 mmol – 4,0 éq.)
- CuSO_4 0,1M aq. (0,073 mL – 0,007 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,220 mL – 0,022 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (0,480 mL).

Après 18h, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH_2Cl_2 , est lavé par H_2O (4x). La phase aqueuse est contre-extraite par CH_2Cl_2 . Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15) pour donner le composé **166** (0,049 g – 0,024 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 51%

CCM : $R_f = 0,29$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15)

PF : 139 – 141 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3144 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2958 ; 2922 ; 2850 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1745 (C=O ester, ν) ; 1639 (C=O amide, ν).

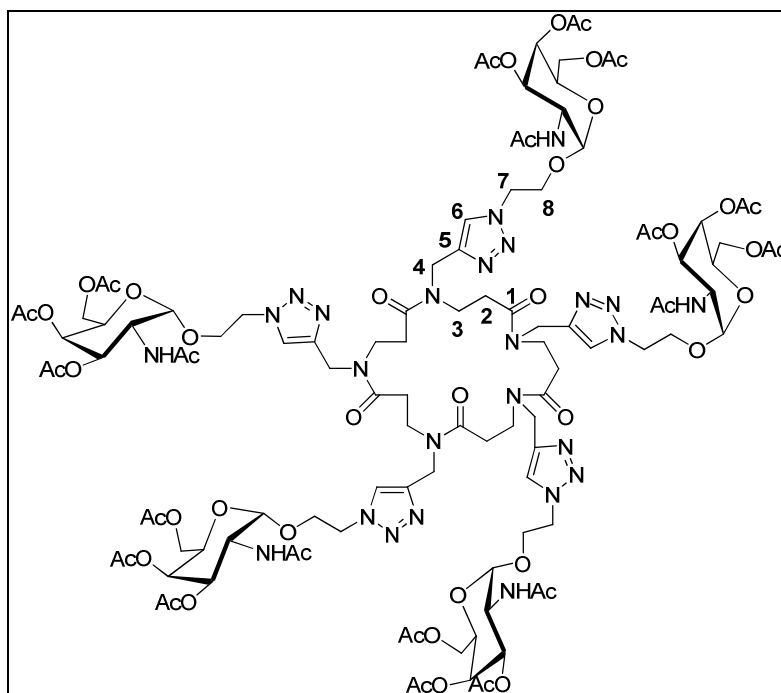
HR-MS : m/z calculé pour $[C_{88}H_{128}N_{20}O_{38}+2H]^{2+}$ 1051,4220 ; trouvé 1051,4225 (0,5 ppm).

HPLC : $t_R = 23,6$ min ($H_2O/MeCN$ 70:30).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,96 ; 1,97 ; 1,98 ; 2,00 ; 2,05 ; 2,14 (s, 48H, CH_3 OAc, CH_3 NHAc) ; 2,79 (m, 8H, $8H_2$) ; 3,86 (m, 28H, $8H_7$, $8H_8$, $8H_{6su}$, $4H_{5su}$) ; 4,59 (m, 20H, $8H_4$, $8H_3$, $4H_{2su}$) ; 4,93 (m, 4H, H_{1su}) ; 5,06 (4H, H_{3su}) ; 5,36 (m, 4H, H_{4su}) ; 6,44 (m, 4H, NHAc) ; 7,82 (m, 4H, H_6).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 20,6 ; 23,0 (CH_3 OAc, CH_3 NHAc) ; 31,6 ; 31,8 ; 32,1 ; 32,2 ; ($4C_2$) ; 41,1 ; 41,3 ; 41,6 ; 41,7 ; 41,7 ; 43,5 ; 43,7 ; 44,2 ; 44,7 ; 44,8 ; 45,0 ; 45,1 ; 45,4 ($4C_3$, $4C_4$) ; 47,4 ; 47,4 ($4C_{2su}$) ; 49,6 ; 49,7 ; 49,8 ; 49,9 ($4C_7$) ; 61,9 ; 62,1 ($4C_{6su}$) ; 66,2 ; 66,4 ($4C_8$) ; 67,0 ; 67,1 ; 67,2 ; 68,0 ; 68,2 ($4C_{3su}$, $4C_{4su}$, $4C_{5su}$) ; 97,7 ; 97,8 ; 97,9 ; 98,0 ; 98,1 ($4C_{1su}$) ; 122,4 ; 123,4 ; 124,1 ; 124,3 ; 124,5 ($4C_6$) ; 143,9 ; 144,1 ; 144,2 ; 144,4 ($4C_5$) ; 170,2 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,5 ; 170,7 ($4C_1$, C=O OAc, C=O NHAc).

Tétramère « peptoïde » cyclique glycosylé GalNAc (**167**)



$C_{110}H_{155}N_{25}O_{50}$

2627,55 g/mol

Le composé **167** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Pentamère cyclique **165** (0,020 g – 0,037 mmol)

- Sucre **116** (0,076 g – 0,183 mmol – 5,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,077 mL – 0,008 mmol – 0,21 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,235 mL – 0,024 mmol – 0,64 éq.)
- DMF (0,378 mL).

Après 18h, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé 4 fois par H₂O. La phase aqueuse est contre-extraite par CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 85:15 à 82:18) pour donner le composé **167** (0,053 g – 0,020 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 55%

CCM : R_f = 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

PF : 145 – 148 °C

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3142 (Csp₂-H, ν) ; 2949 ; 2924 ; 2853 (Csp₃-H, ν) ; 1744 (C=O ester, ν) ; 1638 (C=O amide, ν).

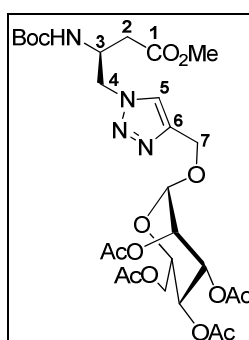
HR-MS : m/z calculé pour [C₁₁₀H₁₅₅N₂₅O₅₀+3H]³⁺ 876,3530 ; trouvé 876,3551 (-2,4 ppm).

HPLC : t_R = 6,1 min (H₂O/MeCN 70 : 30)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,94 ; 1,96 ; 1,97 ; 2,04 ; 2,05 ; 2,14 (s, 60H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,78 (m, 10H, H₂) ; 3,84 (m, 35H, 10H₇, 10H₈, 10H_{6su}, 5H_{5su}) ; 4,56 (m, 25H, 10H₄, 10H₃, 5H_{2su}) ; 4,92 (m, 5H, H_{1su}) ; 5,07 (m, 5H, H_{3su}) ; 5,35 (m, 5H, H_{4su}) ; 6,59 (m, 5H, NHAc) ; 7,81 (m, 5H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,7 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 31,8 (5C₂) ; 41,1 ; 41,3 ; 41,4 ; 42,7 ; 43,54 ; 43,6 ; 43,8 ; 44,3 ; 44,6 ; 44,8 (5C₄, 5C₃) ; 47,5 (5C_{2su}) ; 49,8 (5C₇) ; 62,0 (5C_{6su}) ; 66,4 (4C₈) ; 67,1 ; 67,2 ; 68,0 ; 68,1 (5C_{3su}, 5C_{4su}, 5C_{5su}) ; 97,9 (5C_{1su}) ; 123,0 ; 124,3 (5C₆) ; 170,4 ; 170,5 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 (5C₁, C=O OAc, C=O NHAc).

Monomère « azoture » glycosylé Man(OAc) (**168**)



644,62 g/mol

Le composé **168** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Monomère **85** (0,100 g – 0,387 mmol)
- Sucre **115** (0,150 g – 0,387 mmol – 1,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,620 mL – 0,062 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (1,858 mL – 0,186 mmol)
- DMF (3 mL)

Après 4h de réaction, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 98:2 à 95:5) pour donner le composé **168** (0,197 g – 0,306 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 79%

CCM : R_f = 0,44 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

PF : 52 – 54 °C

$[\alpha]_D^{21} = + 32,6$ (c 0,285 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3360 (N-H, ν) ; 3142 (Csp₂-H, ν) ; 2978 ; 2958 (Csp₃-H, ν) ; 1743 ; 1716 (C=O ester, C=O carbamate, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₂₇H₄₀N₄O₁₄+H]⁺ 645,2619 ; trouvé 645,2632 (2,0 ppm)

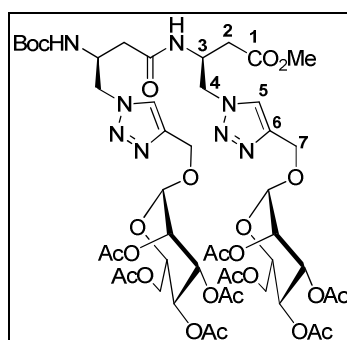
HPLC : t_R = 6,8 min (H₂O/MeOH 20:80)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,28 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 1,86 ; 1,92 ; 2,00 ; 2,03 (4s, 12H, CH₃ OAc) ; 2,48 (m, 2H, H₂) ; 3,59 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,97 (m, 1H, H_{5su}) ; 4,0

(d, 1H, $J_{H6su-H6'su} = 12,4$ Hz, H_{6su}) ; 4,18 (dd, 1H, $J_{H6'su-H5su} = 4,7$ Hz, $J_{H6'su-H6su} = 12,1$ Hz, $H_{6'su}$) ; 4,24 (m, 1H, H_3) ; 4,51 (m, 2H, H_4) ; 4,56 (d, 1H, $J_{H7-H7'} = 12,4$ Hz, H_7) ; 4,73 (d, 1H, $J_{H7'-H7} = 12,3$ Hz, $H_{7'}$) ; 4,84 (s, 1H, H_{1su}) ; 5,09 (s, 1H, H_{2su}) ; 5,18 (m, 2H, H_{3su} , H_{4su}) ; 5,45 (d, 1H, $J_{NH-H3} = 7,9$ Hz, NH) ; 7,60 (s, 1H, H_5).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 20,3 ; 20,4 ; 20,5 ; 20,6 (CH_3 OAc) ; 27,9 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 35,5 (C_2) ; 47,4 (C_3) ; 51,7 (C_4) ; 52,0 (CH_3 CO_2Me) ; 60,4 (C_7) ; 62,1 (C_{6su}) ; 65,8 (C_{4su}) ; 68,4 (C_{5su}) ; 68,7 (C_{3su}) ; 69,2 (C_{2su}) ; 79,7 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 96,4 (C_{1su}) ; 124,0 (C_5) ; 143,0 (C_6) ; 154,8 ($C=O$ Boc) ; 169,4 ; 169,5 ; 169,8 ; 170,4 ($C=O$ OAc) ; 170,9 (C_1).

Dimère « azoture » glycosylé Man(OAc) (**169**)



1157,09 g/mol

Le composé **169** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Dimère **88** (0,075g – 0,194 mmol)
- Sucre **115** (0,150g – 0,388 mmol – 2,0 éq.)
- $CuSO_4$ 0,1M aq. (0,311 mL – 0,031 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,932 mL – 0,093 mmol)
- DMF (1,2 mL)

Le DMF est évaporé sous vide après 4h de réaction et le résidu solubilisé dans CH_2Cl_2 est lavé par H_2O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/MeOH 98:2) pour donner le composé **169** (1,197 g – 0,171 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 88%

CCM : R_f = 0,4 (AcOEt/MeOH 98:2)

PF : 85 – 89 °C

$[\alpha]_D^{26} = + 32,7$ (c 0,545 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3342 ; 3308 (N-H, ν) ; 3140 ; 3074 (C_{sp2}-H, ν) ; 2964 (C_{sp3}-H, ν) ; 1745 (C=O ester, C=O carbamate, ν) ; 1664 (C=O amide, ν).

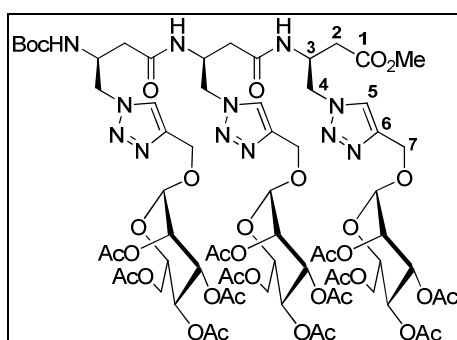
HR-MS : m/z calculé pour [C₄₈H₆₈N₈O₂₅+H]⁺ 1157,4374 ; trouvé 1157,4393 (1,7 ppm).

HPLC : t_R = 10,5 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 1,96 ; 2,02 ; 2,03 ; 2,10 ; 2,12 (s, 24H, CH₃ OAc) ; 2,27 (dd, 1H, J_{H2A-H3A} = 6,8 Hz, J_{H2A-H2'A} = 15,5 Hz, H_{2A}) ; 2,32 (dd, 1H, J_{H2'A-H3A} = 5,1 Hz, J_{H2'A-H2A} = 15,8 Hz, H_{2'A}) ; 2,65 (d, 2H, J = 5,2 Hz, H_{2B}) ; 3,69 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,08 (m, 4H, 2H_{5su}, 2H_{6su}) ; 4,26 (m, 3H, H_{3A}, 2H_{6'su}) ; 4,55 (m, 4H, H₄) ; 4,64 (m, 1H, H_{3B}) ; 4,68 (m, 2H, H₇) ; 4,84 (t, 2H, J = 10,2 Hz, H_{7'}) ; 4,93 (s, 1H, H_{1su}) ; 4,95 (s, 1H, H_{1su}) ; 5,13 (s, 1H, H_{2su}) ; 5,18 (s, 1H, H_{2su}) ; 5,28 (m, 4H, 2H_{3su}, 2H_{4su}) ; 5,81 (d, 1H, J_{NHA-H3A} = 7,8 Hz, NH_A) ; 6,87 (d, 1H, J_{NHB-H3B} = 6,8 Hz, NH_B) ; 7,74 (s, 1H, H₅) ; 7,78 (s, 1H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 ; 20,69 ; 20,77 ; 20,8 (CH₃ OAc) ; 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,4 (C_{2B}) ; 36,7 (C_{2A}) ; 46,6 (C_{3B}) ; 47,9 (C_{3A}) ; 51,7 51,9 (2C₄) ; 52,1 (CH₃ CO₂Me) ; 60,6 60,8 (C₇) ; 62,3 (2C_{6su}) ; 65,9 (2C_{4su}) ; 68,6 (2C_{5su}) ; 68,9 ; 68,99 (2C_{4su}) ; 69,4 ; 69,6 (2C_{2su}) ; 79,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 96,3 ; 96,7 (2C_{1su}) ; 124,3 ; 124,6 (2C₅) ; 143,1 ; 143,6 (2C₆) ; 155,1 (C=O Boc) ; 169,6 (C=O OAc) ; 169,86 (C_{1A}) ; 169,99 ; 170,0 ; 170,2 ; 170,6 (C=O OAc) ; 170,9 (C_{1B}).

Trimère « azoture » glycosylé Man(OAc) (**170**)



1669,56 g/mol

Le composé **170** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Trimère **91** (0,100 g – 0,196 mmol)
- Sucre **115** (0,227 g – 0,598 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO_4 0,1M aq. (0,313 mL – 0,031 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,940 mL – 0,094 mmol)
- DMF (2,4 mL)

Après 4h de réaction, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH_2Cl_2 , est lavé par H_2O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ de 95:5 à 90:10) pour donner le composé **170** (0,281 g – 0,169 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 86%

CCM : $R_f = 0,46$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10)

PF : 152 – 155 °C

$[\alpha]_D^{21} = + 52,2$ (c 0,525 – CHCl_3)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3302 (N-H, ν) ; 3068 ($\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, ν) ; 2947 ; 2838 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, ν) ; 1748 (C=O ester) ; 1701 (C=O carbamate, ν) ; 1670 ; 1657 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{69}\text{H}_{96}\text{N}_{12}\text{O}_{36}+2\text{H}]^{2+}$ 835,3098 ; trouvé 835,3084 (1,7 ppm).

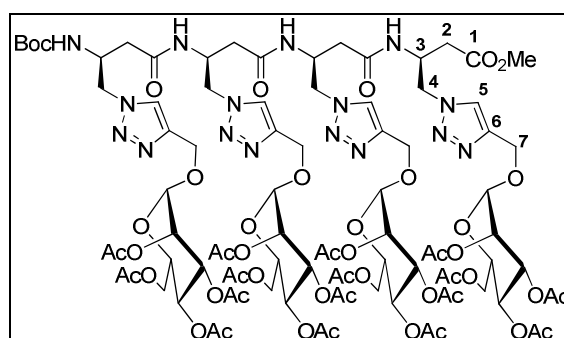
HPLC : $t_R = 12,1$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 1,94 ; 1,95 ; 2,01 ; 2,02 ; 2,10 ; 2,11 ; 2,13 (s, 36H, CH_3 OAc) ; 2,30 (dd, 1H, $J_{\text{H}2\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 4,1$ Hz, $J_{\text{H}2\text{B}-\text{H}2'\text{B}} = 15,1$ Hz,

H_{2B}) ; 2,39 (dd, 1H, $J_{H_2'B-H_3B} = 4,2$ Hz, $J_{H_2'B-H_2B} = 15,1$ Hz, H_{2'B}) ; 2,46 (se, 2H, H_{2A}) ; 2,79 (se, 2H, H_{2C}) ; 3,71 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 4,05 (m, 3H, H_{5su}) ; 4,10 (m, 3H, H_{6su}) ; 4,21 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,29 (m, 5H, 3H_{6'su}, 2H₄) ; 4,50 (m, 2H, H₄) ; 4,66 (m, 7H, H_{3B}, H_{3C}, 2H₄, 3H₇) ; 4,82 (m, 3H, H₇) ; 4,94 (d, 3H, $J = 6,1$ Hz, H_{1su}) ; 5,17 (s, 3H, H_{2su}) ; 5,27 (m, 6H, 3H_{3su}, 3H_{4su}) ; 6,40 (d, 1H, $J_{NHA-H_3A} = 7,2$ Hz, NH_A) ; 7,35 (d, 1H, $J_{NHB-H_3B} = 8,5$ Hz, NH_B) ; 7,42 (d, 1H, $J_{NHC-H_3C} = 6,9$ Hz, NH_C) ; 7,70 ; 7,83 ; 7,96 (3s, 3H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 ; 20,8 (CH₃ OAc) ; 28,3 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,7 (C_{2A}) ; 35,9 (C_{2C}) ; 37,8 (C_{2B}) ; 46,6 (C_{3B}) ; 47,1 (C_{3C}) ; 48,1 (C_{3A}) ; 51,3 (C₄) ; 52,1 (CH₃ CO₂Me) ; 52,2 ; 52,7 (2C₄) ; 60,7 ; 60,6 ; 60,8 (3C₇) ; 62,3 (3C_{6su}) ; 66,0 (3C_{4su}) ; 68,6 ; 68,7 (3C_{5su}) ; 68,9 ; 69,1 (3C_{3su}) ; 69,3 ; 69,5 (3C_{2su}) ; 79,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 96,5 ; 96,6 ; 96,6 (3C_{1su}) ; 124,6 ; 124,7 ; 124,8 (3C₅) ; 143,0 ; 143,2 ; 143,8 (3C₆) ; 155,3 (C=O Boc) ; 169,3 (C_{1B}) ; 169,6 ; 169,9 ; 170,0 (C=O OAc) ; 170,1 (C_{1A}, C=O OAc) ; 170,6 ; 170,7 (C=O OAc) ; 170,9 (C_{1C}).

Tétramère « azoture » glycosylé Man(OAc) (**171**)



C₉₀H₁₂₄N₁₆O₄₇

2182,03

Le composé **171** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Tétramère **92** (0,050g – 0,078 mmol)
- Sucre **115** (0,121g – 0,314 mmol – 4,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,126 mL – 0,013 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,378 mL – 0,038 mmol)
- DMF (0,4 mL dilué à 1,6mL)

Après 4 h de réaction, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH_2Cl_2 , est lavé par H_2O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/MeOH 90:10) pour donner le composé **171** (0,140 g – 0,064 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 82%

CCM : Rf = 0,45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10)

PF : 183-185 °C

$[\alpha]_D^{21} = +43,2$ (c 0,505 – CHCl_3)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3291 (N-H, ν) ; 3064 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2963 ; 2934 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1746 (C=O ester, ν) ; 1690 (C=O carbamate, ν) ; 1653 (C=O amide, ν).

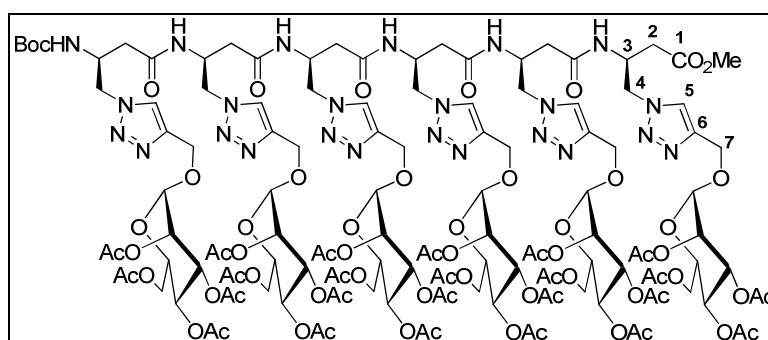
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{90}\text{H}_{124}\text{N}_{16}\text{O}_{47}+2\text{H}]^{2+}$ 1091,8990 ; trouvé 1091,3982 (-0,6 ppm).

HPLC : $t_R = 15,2$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 1,93 ; 1,94 ; 2,00 ; 2,01 ; 2,09 ; 2,10 ; 2,11 (s, 48H, CH_3 OAc) ; 2,41 (m, 6H, 6H_2) ; 2,68 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz, H_{2D}) ; 3,69 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 4,09 (m, 9H, $4\text{H}_{5\text{su}}$, $4\text{H}_{6\text{su}}$, H_{3A}) ; 4,27 (m, 4H, $\text{H}_{6'\text{su}}$) ; 4,46 (dd, 2H, $J_{\text{H}4\text{-H}3} = 5,8$ Hz, $J_{\text{H}4\text{-H}4'} = 14,0$ Hz, H_4) ; 4,61 (m, 13H, 3H_3 , 2H_4 , 8H_7) ; 4,78 (t, 4H, $J = 12,1$ Hz, H_4) ; 4,92 (s, 4H, $\text{H}_{1\text{su}}$) ; 5,16 (s, 4H, $\text{H}_{2\text{su}}$) ; 5,25 (m, 8H, $4\text{H}_{3\text{su}}$, $4\text{H}_{4\text{su}}$) ; 6,23 (d, 1H, $J_{\text{NHA-H}3A} = 7,5$ Hz, NH_A) ; 7,03 (se, 1H, NH) ; 7,69 (d, 1H, $J_{\text{NHD-H}3} = 7,8$ Hz, NH_D) ; 7,73 ; 7,79 ; 7,85 ; 7,87 (4s, 4H, H_5) ; 8,01 (d, 1H, $J_{\text{NH-H}3} = 7,6$ Hz, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 ; 20,8 (CH_3 OAc) ; 28,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 35,8 (C_{2D}) ; 36,0 (C_2) ; 36,8 (C_{2A}) ; 37,0 (C_2) ; 46,7 (C_{3D} C_3) ; 46,9 (C_3) ; 48,3 (C_{3A}) ; 52,0 (C_4) ; 52,1 (CH_3 CO_2Me) ; 52,3 ; 52,4 ; 52,6 (3C_4) ; 59,9 ; 60,2 ; 60,5 (4C_7) ; 62,3 ($4\text{C}_{6\text{su}}$) ; 65,8 ; 65,9 ($4\text{C}_{3\text{su}}$) ; 68,6 ; 68,6 ; 68,7 ($4\text{C}_{5\text{su}}$) ; 69,0 ($4\text{C}_{4\text{su}}$) ; 69,2 ; 69,3 ($4\text{C}_{2\text{su}}$) ; 79,8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 96,2 ; 96,3 ; 96,4 ; 96,5 ($4\text{C}_{1\text{su}}$) ; 124,6 ; 124,7 ; 124,8 (4C_5) ; 142,9 ; 143,1 ; 143,1 (4C_6) ; 155,3 (C=O Boc) ; 169,5 ; 169,6 ; 169,7 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,0 ; 170,6 (C=O OAc, 3C_1) ; 170,7 (C_{1D}).

Hexamère « azoture » glycosylé Man(OAc) (**172**)



3206,96 g/mol

Le composé **172** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Hexamère **94** (0,040g – 0,045 mmol)
- Sucre **115** (0,104g – 0,270 mmol – 6,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,072 mL – 0,008 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,216 mL – 0,022 mmol)
- DMF (0,25 mL dilué à 2mL)

Après, 8h, de réaction, le DMF est évaporé sous vide et le résidu, solubilisé dans CH₂Cl₂, est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/MeOH 90:10) pour donner le composé **172** (0,110 g – 0,034 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 76%

CCM : R_f = 0,25 (AcOEt/MeOH 90:10)

PF : 190-192 °C

$[\alpha]_D^{21} = + 53,7$ (c 0,490 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3363 ; 3285 (N-H, ν) ; 3132 ; 3084 (C_{sp2}-H, ν) ; 2956 ; 2926 ; 2855 (C_{sp3}-H, ν) ; 1748 (C=O ester, C=O carbamate, ν) ; 1655 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₃₂H₁₈₀N₂₄O₆₉+2H]²⁺ 1603,5730 ; trouvé 1603,5726 (0,2 ppm).

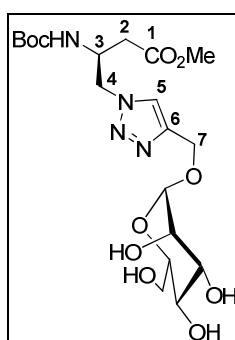
HPLC : t_R = 13,6 min (H₂O/MeOH 30 :70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,37 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 1,94 ; 1,96 ; 2,00 ; 2,01 ; 2,03 ; 2,08 ; 2,09 ; 2,11 (s, 72H, CH₃ OAc) ; 2,39 (m, 10H, H₂) ; 2,69 (d, 2H, J = 6,1 Hz,

H_{2F}) ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me : 4,08 (m, 12H, 6H_{5su}, 6H_{6su}) ; 4,28 (m, 7H, H_{3A}, 6H_{6'su}) ; 4,55 (m, 23H, 5H₃, 12H₄, 6H₇) ; 4,78 (m, 6H, H_{7'}) ; 4,91 – 4,95 (m, H, 6H_{1su}) ; 5,16 (m, 6H, H_{2su}) ; 5,26 (m, 12H, 6H_{3su}, 6H_{4su}) ; 6,16 (d, 1H, $J_{\text{NHA-H3A}} = 6,2$ Hz, NH_A) ; 6,97 (se, 1H, NH) ; 7,47 7,54 7,61 (se, 3H, NH) ; 7,83 (m, 1H, NH) ; 7,77 ; 7,83 ; 7,86 ; 7,88 ; 7,97 ; 7,98 (6s, 6H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 20,7 20,8 (CH₃ OAc) ; 28,2 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,9 ; 37,0 ; 37,1 ; 37,2 ; 37,4 ; 37,5 (6C₂) ; 46,7 ; 47,0 ; 47,1 ; 47,4 ; 48,1 (6C₃) ; 52,0 (1C₄) ; 52,1 (CH₃ CO₂Me) ; 52,4 ; 52,5 ; 52,6 ; 53,0 (5C₄) ; 59,5 ; 60,2 ; 60,5 (6C₇) ; 62,3 (6C_{6su}) ; 65,9 (6C_{4su}) ; 68,6 ; 68,8 ; 69,2 ; 69,3 (6C_{2su}, 6C_{3su}, 6C_{5su}) ; 79,7 (C(CH₃)₃ Boc) ; 95,7 ; 96,3 ; 96,5 ; 96,6 (6C_{1su}) ; 124,7 ; 125,0 (6C₅) ; 142,8 ; 142,9 ; 143,0 (6C₆) ; 155,3 (C=O Boc) ; 169,6 ; 169,7 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,1 ; 170,2 ; 170,4 ; 170,6 ; 171,0 (6C₁ C=O OAc).

Monomère « azoture » glycosylé Man(OH) (173)



C₁₉H₃₂N₄O₁₀

476,48 g/mol

Une solution de composé **168** (0,050 g – 0,078 mmol) dans 10 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL) à température ambiante, pendant 2h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée par H₂O et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **173** (0,037 g – 0,078 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,45 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 74 – 77 °C

$[\alpha]_D^{21} = + 47,3$ (c 0,275 – H₂O)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3360 (O-H, N-H, ν) ; 2976 ; 2930 ; 2855 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1724 (C=O ester) ; 1693 (C=O carbamate, ν).

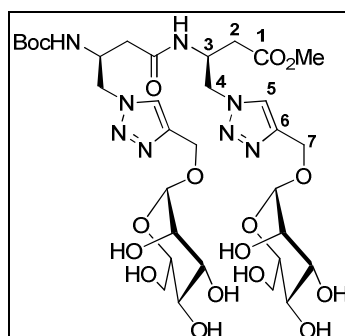
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}+\text{H}]^+$ 477,2197; trouvé 477,2198 (0,3 ppm).

HPLC : $t_R = 5,5$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 10:90)

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 1,34 ; 1,37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 2,56 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2\text{-H}_3} = 7,6$ Hz, $J_{\text{H}_2\text{-H}_2'} = 16,0$ Hz, H_2) ; 2,64 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2'\text{-H}_3} = 5,8$ Hz, $J_{\text{H}_2'\text{-H}_2} = 16,0$ Hz, H_2') ; 3,72 (m, 9H, CH_3 CO_2Me , 6H_{su}) ; 4,36 (m, 1H, H_3) ; 4,48 (dd, 1H, $J_{\text{H}_4\text{-H}_3} = 8,2$ Hz, $J_{\text{H}_4\text{-H}_4'} = 13,9$ Hz, H_4) ; 4,59 (dd, 1H, $J_{\text{H}_4'\text{-H}_3} = 4,7$ Hz, $J_{\text{H}_4'\text{-H}_4} = 13,6$ Hz, H_4') ; 4,63 (d, 1H, $J_{\text{H}_7\text{-H}_7'} = 12,4$ Hz, H_7) ; 4,80 (d, 1H, $J_{\text{H}_7'\text{-H}_7} = 12,4$ Hz, H_7') ; 4,86 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{su}}$) ; 7,97 (s, 1H, H_5).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 27,0 ; 27,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 36,0 (C_2) ; 47,9 (C_3) ; 50,9 (CH_3 CO_2Me) ; 52,5 (C_4) ; 59,2 (C_7) ; 61,5 ($\text{C}_{6\text{su}}$) ; 67,2 ; 70,5 ; 71,0 ; 73,5 (4C_{su}) ; 79,1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 99,3 ($\text{C}_{1\text{su}}$) ; 124,6 (C_5) ; 143,8 (C_6) ; 155,9 (C=O Boc) ; 171,1 (C_1).

Dimère « azoture » glycosylé Man(OH) (174)



$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_{17}$

820,80 g/mol

Une solution de composé **169** (0,050 g – 0,043 mmol) dans 2 mL de MeOH anhydre est traitée par 0,250 mL d'une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL) pendant 1h30. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par H_2O et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **174** (0,034 g – 0,042 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 97%

CCM : $R_f = 0,39$ (n-propanol/ H_2O 90:10)

PF : 130 – 132 °C

$$[\alpha]_D^{29} = + 51,2 \text{ (c 0,400 – MeOH)}$$

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3329 (O-H, N-H, ν) ; 2929 (C_{sp^3} -H, ν) ; 1724 (C=O ester) ; 1685 (C=O carbamate, ν) ; 1678 (C=O amide, ν).

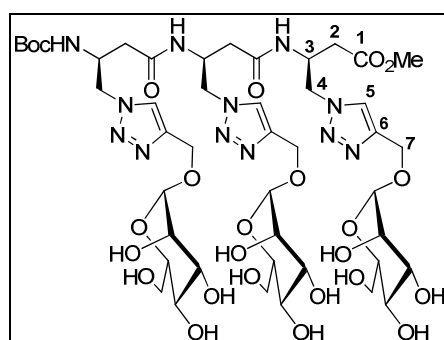
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_{17}+\text{H}]^+$ 821,3529 ; trouvé 821,3525 (-0,4 ppm).

HPLC : $t_{\text{R}} = 5,9$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) : 1,20 ; 1,28 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 2,42 (m, 1H, $\text{H}_{2\text{A}}$) ; 2,48 (dd, 1H, $J_{\text{H}2'\text{A}-\text{H}3\text{A}} = 5,5$ Hz, $J_{\text{H}2'\text{A}-\text{H}2\text{A}} = 9,5$ Hz, $\text{H}_{2'\text{A}}$) ; 2,65 (dd, 1H, $J_{\text{H}2\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 8,7$ Hz, $J_{\text{H}2\text{B}-\text{H}2'\text{B}} = 16,2$ Hz, $\text{H}_{2\text{B}}$) ; 2,84 (dd, 1H, $J_{\text{H}2'\text{B}-\text{H}3\text{B}} = 4,9$ Hz, $J_{\text{H}2'\text{B}-\text{H}2\text{B}} = 16,2$ Hz, $\text{H}_{2'\text{B}}$) ; 3,68 (m, 7H, CH_3 CO_2Me , 4H_{su}) ; 3,78 (m, 4H, H_{su}) ; 3,90 (m, 4H, H_{su}) ; 4,30 (m, 2H, $\text{H}_{3\text{A}}$, H_4) ; 4,49 (dd, 1H, $J_{\text{H}4'-\text{H}3} = 2,7$ Hz, $J_{\text{H}4'-\text{H}4} = 13,3$ Hz, $\text{H}_{4'}$) ; 4,53 (dd, 1H, $J_{\text{H}4-\text{H}3} = 8,6$ Hz, $J_{\text{H}4-\text{H}4'} = 13,9$ Hz, H_4) ; 4,69 (m, 4H, $\text{H}_{3\text{B}}$, H_4 , 2H_7) ; 4,83 (m, 2H, $\text{H}_{7'}$) ; 4,97 (m, 2H, $\text{H}_{1\text{su}}$) ; 8,07 8,11 (s, 2H, H_5).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ (ppm) : 27,2 ; 27,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 36,1 ($\text{C}_{2\text{B}}$) ; 37,7 ; 37,8 ($\text{C}_{2\text{A}}$) ; 46,8 ($\text{C}_{3\text{B}}$) ; 48,3 ($\text{C}_{3\text{A}}$) ; 52,6 (CH_3 CO_2Me) ; 52,7 ; 53,4 ; 53,9 (2C_4) ; 59,5 (2C_7) ; 60,9 ($2\text{C}_{6\text{su}}$) ; 66,7 ; 69,9 ; 70,5 ; 72,9 ($2\text{C}_{2\text{su}}$, $2\text{C}_{3\text{su}}$, $2\text{C}_{4\text{su}}$, $2\text{C}_{5\text{su}}$) ; 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc) ; 99,2 ; 99,6 ($2\text{C}_{1\text{su}}$) ; 125,8 ; 125,9 ; 126,0 (2C_5) ; 143,4 ; 143,6 (2C_6) ; 156,5 (C=O Boc) ; 171,5 ($\text{C}_{1\text{A}}$) ; 172,6 ($\text{C}_{1\text{B}}$).

Trimère « azoture » glycosylé Man(OH) (175)



$\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{N}_{12}\text{O}_{24}$

1165,12 g/mol

Une solution de composé **170** (0,050 g – 0,030 mmol) dans 8,5 mL de MeOH anhydre est traitée par 1,14 mL d'une solution de MeONa (0,040 g dans 25 mL) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par H_2O et le

filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **175** (0,034 g – 0,030 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,65 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 174 – 177 °C

$[\alpha]_D^{21} = +44,2$ (c 0,205 – H₂O)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3306 (O-H, N-H, ν) ; 2926 (C_{sp3}-H, ν) ; 1736 (C=O ester) ; 1687 (C=O carbamate, ν) ; 1645 (C=O amide, ν).

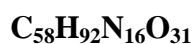
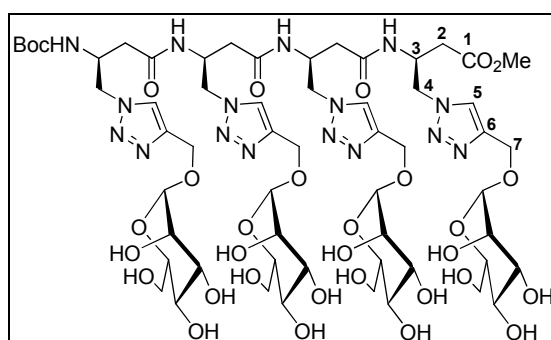
HR-MS : m/z calculé pour [C₄₅H₇₂N₁₂O₂₄+2H]²⁺ 583,2464; trouvé 583,2451 (2,2 ppm).

HPLC : t_R = 5,4 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,17 ; 1,26 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,46 (m, 3H, H₂) ; 2,53 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 6,1 Hz, J_{H2-H2'} = 15,2 Hz, H₂) ; 2,64 (dd, 1H, J_{H2C-H3C} = 8,8 Hz, J_{H2C-H2'C} = 16,4 Hz, H_{2C}) ; 2,82 (dd, 1H, J_{H2'C-H3C} = 4,6 Hz, J_{H2'C-H2C} = 16,4 Hz, H_{2'C}) ; 3,66 (m, 9H, CH₃ CO₂Me, 6H_{su}) ; 3,77 (m, 6H, H_{su}) ; 3,88 (m, 6H, H_{su}) ; 4,26 (m, 1H, H₃) ; 4,53 (m, 14H, 2H₃, 6H₄, 6H₇) ; 4,94 4,97 4,99 (s, 3H, H_{1su}) ; 8,05 ; 8,09 ; 8,11 (2s, 3H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 27,2 ; 27,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,8 ; 37,5 ; 37,8 (3C₂) ; 46,6 ; 47,1 ; 48,1 (3C₃) ; 52,5 (CH₃ CO₂Me) ; 52,7 ; 53,4 ; 53,8 (3C₄) ; 59,5 ; 59,7 (3C₇) ; 60,9 (3C_{6su}) ; 66,7 ; 69,9 ; 70,5 ; 73,0 (3C_{2su}, 3C_{3su}, 3C_{4su}, 3C_{5su}) ; 81,0 (C(CH₃)₃ Boc) ; 99,2 ; 99,6 (3C_{1su}) ; 125,7 ; 125,8 (3C₅) ; 143,4 ; 143,7 (3C₆) ; 171,1 ; 171,3 ; 172,6 (3C₁).

Tétramère « azoture » glycosylé Man(OH) (176)



1509,44 g/mol

Une solution de composé **171** (0,040 g – 0,018 mmol) dans 0,85 mL de MeOH anhydre est traitée par 0,64 mL d'une solution de MeONa (0,050 g dans 25 mL) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée par H₂O et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **176** (0,027 mmol – 0,018 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,56 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 178 – 180 °C

$[\alpha]_D^{22} = + 33,1$ (c 0,275 – H₂O)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3296 (O-H, N-H, ν) ; 3136 ; 3099 (Csp₂-H, ν) ; 2930 (Csp₃-H, ν) ; 1736 (C=O ester) ; 1683 (C=O carbamate, ν) ; 1653 (C=O amide, ν).

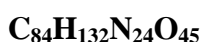
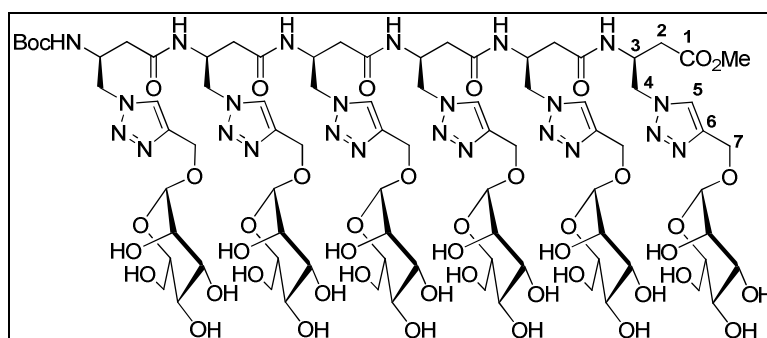
HR-MS : m/z calculé pour [C₅₈H₉₂N₁₆O₃₁+2H]²⁺ 755,3130 ; trouvé 755,3120 (1,3 ppm).

HPLC : t_R = 4,9 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,15 ; 1,23 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,48 (m, 6H, H₂) ; 2,64 (dd, 1H, J_{H₂D-H₃D} = 8,8 Hz, J_{H₂D-H₂'D} = 16,0 Hz, H₂D) ; 2,82 (d, 1H, J_{H₂'D-H₂D} = 16,0 Hz, H₂'D) ; 3,66 (m, 11H, CH₃ CO₂Me, 8_{H_{su}}) ; 3,77 (m, 8H, H_{su}) ; 3,88 (m, 8H, H_{su}) ; 4,40 (m, 20H, 4H₃, 8H₄, 8H₇) ; 4,94 4,97 4,98 (s, 4H, H_{1su}) ; 8,05 8,07 8,11 (s, 4H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 27,2 ; 27,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,8 ; 37,2 ; 37,4 (4C₂) ; 46,6 ; 47,0 ; 48,1 (4C₃) ; 52,5 (CH₃ CO₂Me) ; 52,6 ; 53,4 (4C₄) ; 59,5 (4C₇) ; 60,9 (4C_{6su}) ; 66,7 ; 69,9 ; 70,5 ; 73,0 (4C_{2su}, 4C_{3su}, 4C_{4su}, 4C_{5su}) ; 80,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 99,2 (4C_{1su}) ; 125,7 ; 125,8 (4C₅) ; 143,6 ; 143,7 (4C₆) ; 156,4 (C=O Boc) ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 ; 171,3 ; 172,6 (4C₁).

Hexamère « azoture » glycosylé Man(OH) (177)



2198,08 g/mol

Une solution de composé **172** (0,040 g – 0,013 mmol) dans 0,85 mL de MeOH anhydre est traitée par 0,44 mL d'une solution de MeONa (0,050 g dans 25 mL) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée par H₂O et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **177** (0,028 g – 0,013 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,40 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 189 – 192 °C

$[\alpha]_D^{22} = + 23,9$ (c 0,230 – H₂O)

IR (KBr) v (cm⁻¹) : 3294 (O-H, N-H, v) ; 2934 (Csp₃-H, v) ; 1732 (C=O ester) ; 1678 (C=O carbamate, v) ; 1651 (C=O amide, v).

HR-MS : m/z calculé pour [C₈₄H₁₃₂N₂₄O₄₅+2H]²⁺ 1099,4462; trouvé 1099,4504 (-3,8 ppm).

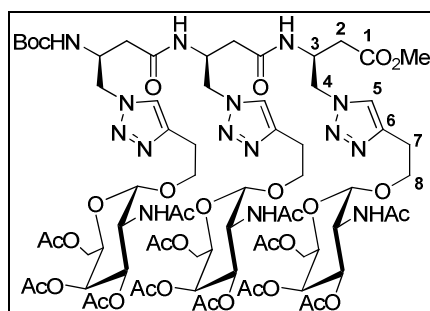
HPLC : t_R = 5,2 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,14 ; 1,22 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 2,47 (m, 10H, H₂) ; 2,67 (dd, 1H, J_{H₂F-H₃F} = 9,4 Hz, J_{H₂F-H₂'F} = 16,6 Hz, H₂F) ; 2,84 (d, 1H, J_{H₂'F-H₃F} = 5,1 Hz, J_{H₂'F-H₂F} = 16,6 Hz, H₂'F) ; 3,66 (m, 15H, CH₃ CO₂Me, 12_{H_{su}}) ; 3,77 (m, 12H, H_{su}) ; 3,88 (m, 12H, H_{su}) ; 4,40 (m, 30H, 6H₃, 12H₄, 12H₇) ; 4,94 ; 4,97 ; 4,98 (s, 6H, H_{1su}) ; 8,05 ; 8,07 ; 8,11 (s, 6H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 27,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 35,7 ; 37,8 ; 37,1 ; 37,2 ; 37,3 (6C₂) ; 46,5 ; 46,6 ; 46,8 ; 46,9 ; 47,0 (6C₃) ; 52,5 (CH₃ CO₂Me) ; 52,7 (6C₄) ; 59,4 (6C₇) ;

60,9 (6C_{6su}) ; 66,7 ; 69,9 ; 70,5 ; 73,0 (6C_{2su}, 6C_{3su}, 6C_{4su}, 6C_{5su}) ; 80,9 (C(CH₃)₃ Boc) ; 99,2 (6C_{1su}) ; 125,8 (6C₅) ; 143,6 (6C₆) ; 156,4 (C=O Boc) ; 170,5 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,2 ; 172,6 (6C₁).

Trimère « azoture » glycosylé GalNAc(OAc) (**178**)



C₇₂H₁₀₅N₁₅O₃₃

1708,68 g/mol

Le composé **178** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Trimère **91** (0,043 g – 0,083 mmol)
- Sucre **117** (0,100 g – 0,250 mmol – 3,0 équ.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,134 mL – 0,013 mmol)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,401 mL – 0,040 mmol)
- DMF (1,2 mL)

Le DMF est évaporé sous vide après 4h de réaction et le résidu solubilisé dans CH₂Cl₂ est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 90:10 à 85:15) pour donner le composé **178** (0,089 g – 0,052 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 63%

CCM : R_f = 0,16 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 126 – 129 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 80,5$ (c 0,585 – CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3338 ; 3302 (N-H, ν) ; 3136 (Csp₂-H, ν) ; 2933 (Csp₃-H, ν) ; 1746 (C=O ester) ; 1635 (C=O carbamate, C=O amide, ν).

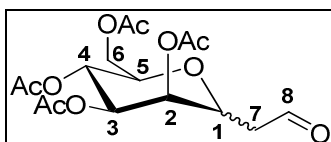
HR-MS : m/z calculé pour $[C_{72}H_{105}N_{15}O_{33}+2H]^{2+}$ 854,8572 ; trouvé 854,8552 (2,3 ppm).

HPLC : $t_R = 8,5$ min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1,35 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc) ; 1,94 ; 1,97 ; 2,01 ; 2,13 (s, 36H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,41 (m, 4H, 2H_{2A}, 2H_{2B}) ; 2,57 (dd, 1H, $J_{H_{2C}-H_{3C}} = 8,2$ Hz, $J_{H_{2C}-H_{2'C}} = 16,5$ Hz, H_{2C}) ; 2,70 (dd, 1H, $J_{H_{2'C}-H_{3C}} = 5,0$ Hz, $J_{H_{2'C}-H_{2C}} = 16,1$ Hz, H_{2'C}) ; 3,03 (m, 6H, H₈) ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,77 (m, 3H, H₇) ; 3,94 (m, 3H, H₇) ; 4,08 (m, 9H, 3H₄, 3H_{5su}, 3H_{6su}) ; 4,27 (m, 1H, H_{3A}) ; 4,44 (m, 11H, H_{3B}, H_{3C}, 3H₄, 3H_{2su}, 3H_{6'su}) ; 4,92 (s, 3H, H_{1su}) ; 5,11 (dd, 3H, $J = 1,9$ Hz, $J = 11,4$ Hz, H_{3su}) ; 5,37 (m, 3H, H_{4su}) ; 6,61 (d, 1H, $J_{NH_A-H_{3A}} = 8,1$ Hz, NH_A) ; 7,84 (s, 1H, 1H₅) ; 7,91 (m, 3H, 2H₅, NH_B) ; 8,04 (d, 3H, NHAc) ; 8,11 (d, 1H, $J_{NH_C-H_{3C}} = 8,6$ Hz, NH_C).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 20,6 ; 20,8 ; 22,8 (CH₃ OAc CH₃ NHAc) ; 26,8 (3C₈) ; 28,8 (C(CH₃)₃ Boc) ; 37,0 (C_{2C}) ; 38,9 ; 39,4 (C_{2A}, C_{2B}) ; 48,2 (C_{3C}) ; 48,4 (C_{3B}) ; 48,9 (3C_{2su}) ; 49,3 (C_{3A}) ; 52,6 (CH₃ CO₂Me) ; 53,6 ; 53,8 ; 54,0 (3C₄) ; 63,2 (3C_{6su}) ; 67,9 (3C_{5su}) ; 68,1 ; 68,3 ; 68,4 (3C₇) ; 68,8 (3C_{4su}) ; 69,8 ; 69,9 (3C_{3su}) ; 80,5 (C(CH₃)₃ Boc) ; 124,7 (3C₅) ; 157,2 (C=O Boc) ; 171,5 ; 171,7 (C_{1A}, C_{1B}) ; 171,9 ; 172,0 ; 172,2 ; 172,2 ; 172,2 (C=O OAc, C=O NHAc) ; 172,4 (C_{1C}) ; 173,6 (C=O OAc, C=O NHAc).

3,7-anhydro-4,5,6,8-tétra-*O*-acétyl-D-glycéro-D-talo-octulopyranose (180)



374,34 g/mol

Une solution de *C*-allyl glycoside **179** (0,500 g – 1,343 mmol) dans 125 mL d'un mélange MeOH/CH₂Cl₂/Pyridine (10:10:1) est refroidie à -78°C puis soumise à un courant d'ozone jusqu'à coloration bleue persistante. La source d'ozone est retirée et le milieu est agité à -78°C pendant 15 min. supplémentaires au bout desquelles l'excès d'ozone est éliminé par un courant d'argon. Le Me₂S (5,0 mL – 67,14 mmol) est ajouté à -78°C et le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant la nuit. Le milieu est dilué dans 200 mL de CH₂Cl₂ et lavé avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite par CH₂Cl₂ (2x). Les phases organiques réunies sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. La pyridine est

éliminée par entraînement azéotropique avec du toluène. On obtient un mélange (0,497 g – 1,33 mmol) dans des proportions 4:1.

Rendement : 99%

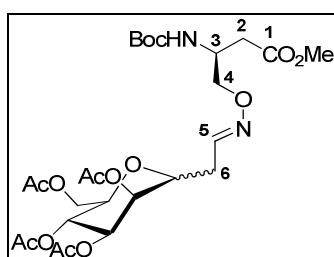
CCM : R_f = 0,50 (AcOEt/Cyclohexane 50:50)

HR-MS : m/z calculé pour [C₁₆H₂₂O₁₀+Na]⁺ 397,1111 ; trouvé 397,1100 (2,7 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *D-glycéro-D-talo* : 2,04 ; 2,04 ; 2,05 ; 2,12 (s, 12H, CH₃ OAc) ; 2,56 – 2,79 (m, 2H, H₇) ; 3,92 (m, 1H, H₅) ; 4,04 (dd, 1H, *J* = 3,4 Hz, *J* = 12,1 Hz, H₆) ; 4,47 – 4,62 (m, 2H, H₁ H_{6'}) ; 5,05 (m, 2H, H₂ H₃) ; 5,21 (dd, 1H, *J* = 3,3 Hz, *J* = 6,8 Hz, H₄) ; 9,67 (m, 1H, H₈).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : *D-glycéro-D-talo* : 20,5 ; 20,6 (CH₃ OAc) ; 43,7 (C₇) ; 61,0 (C₆) ; 67,1 (C₁) ; 67,2 (C₃) ; 67,6 (C₄) ; 69,1 (C₂) ; 72,1 (C₅) ; 169,2 ; 169,5 ; 170,5 (C=O OAc) ; 198,2 (C₈).

Monomère « oxime » C-glycosylé Man(OAc) (**181**)



C₂₆H₄₀N₂O₁₄

604,60 g/mol

Une solution d'aminooxy **102** (0,082 g – 0,330 mmol) et d'aldéhyde **80** (0,123 g – 0,330 mmol) dans 9 mL d'un mélange MeOH/H₂O (1:1) est traitée à 0°C par NaOAc (0,005 g – 0,066 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant la nuit. Le MeOH est évaporé sous vide. Le résidu est extrait par AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane, 60:40) et conduit au composé **181** sous forme d'un mélange de 4 composés (Man_α/(E) – Man_α/(Z) – Man_β/(E) – Man_β/(Z)) dans des proportions (Z)/(E) (1:1) et α/β (4:1).

Rendement : 82%

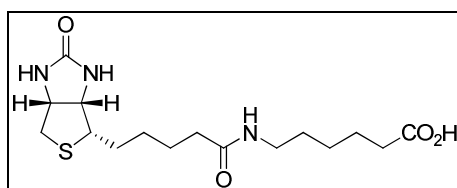
CCM : Rf = 0,82 (AcOEt/Cyclohexane 80:20)

HR-MS : m/z calculé pour $[C_{42}H_{51}N_5O_{15}+H]^+$ 866,3460 ; trouvé 866,3461 (0,1 ppm).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 1,42 (s, 18H, $C(CH_3)_3$ Boc isomères $1\alpha/\beta - 2\alpha/\beta$) ; 1,96 ; 1,97 ; 2,00 ; 2,028 ; 2,03 ; 2,047 ; 2,05 ; 2,076 ; 2,08 ; 2,09 ; 2,10 ; 2,167 ; 2,17 (s, 24H, CH_3 OAc isomères $1\alpha/\beta - 2\alpha/\beta$) ; 2,35 (m, H_6 isomère 2β) ; 2,47 (m, 1H, H_6 isomère 2α) ; 2,56 (m, 7H, H_6 isomère 1α , H_6 isomère 2α , H_6 isomère 1β , H_6 isomère 2β , $2H_2$ isomère $1\alpha/\beta$, $2H_2$ isomère $2\alpha/\beta$) ; 2,75 (m, H_6 isomère 1α) ; 3,67 – 3,68 (CH_3 CO_2Me isomères $1\alpha/\beta - 2\alpha/\beta$) ; 3,83 (t, 1H, $J = 5,7$ Hz, H isomère $1/2\beta$) ; 3,94 (m, 2H, H_{5su} isomères $1\alpha - 2\alpha$) ; 3,99 – 4,34 (m, 10H, H_{1su} isomère $1/2\alpha$, H_{2su} isomère $1/2\alpha$, H_{6su} isomère $1/2\alpha$, $2H_4$ isomère $1\alpha/\beta$, $2H_4$ isomère $2\alpha/\beta$) ; 4,40 (m, $H_{su\beta}$) ; 4,44 – 4,59 (m, 2H, H_{6su} isomère $1/2\alpha$) ; 5,01 – 5,36 (m, 4H, H_{3su} isomère $1/2\alpha$, H_{4su} isomère $1/2\alpha$, H_{su} isomères $1/2\beta$) ; 5,43 (dt, $J = 5,3$ Hz, $J = 15,2$ Hz, $H_{su\beta}$) ; 5,54 (t, $J = 4,7$ Hz, $H_{su\beta}$) ; 6,74 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, H_5 isomère 1α) ; 6,77 (t, $J = 5,1$ Hz, H_5 isomère 1β) ; 7,36 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz, H_5 isomère 2α) ; 7,39 (t, $J = 5,8$ Hz, H_5 isomère 2β).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 20,3 ; 20,5 (CH_3 OAc isomères $1/2\beta$) ; 20,6 ; 20,6 (CH_3 OAc isomères $1/2\alpha$) ; 26,2 (C_6 isomère 1α) ; 27,1 ; 27,1 (C_6 isomère 1β) ; 30,0 (C_6 isomère 2α) ; 30,6 ; 30,9 (C_6 isomère 2β) ; 47,1 ; 47,3 (C_3 isomères $1/2\alpha$, C_3 isomères $1/2\beta$) ; 51,6 ; 51,6 (CH_3 CO_2Me isomères $1\alpha/\beta$, CH_3 CO_2Me isomères $2\alpha/\beta$) ; 61,3 ; 61,5 (C_{6su} isomères $1/2\alpha$) ; 62,6 ; 62, 7 ; 62,7 (C_{6su} isomères $1/2\beta$) ; 65,8 ; 65,9 (C_{su} isomères $1/2\beta$) ; 67,1 ; 67,2 (C_{3su} isomères $1/2\alpha$) ; 67,9 ; 68,0 (C_{4su} isomères $1/2\alpha$) ; 68,4 ; 68,4 ($C_{su\beta}$) ; 69,1 ; 69,2 ($C_{su\beta}$) ; 69,3 (C_{su} isomères $1/2\alpha$) ; 69,4 ($C_{su\beta}$) ; 69,6 (C_{su} isomères $1/2\alpha$) ; 69,8 ($C_{su\beta}$) ; 70,3 (C_{su} isomères $1/2\beta$) ; 70,8 ($C_{su\beta}$) ; 71,5 ; 71,6 (C_{5su} isomères $1/2\alpha$) ; 71,7 ; 71,9 ; 72,0 ; 72,1 ($C_{su\beta}$) ; 74,0 ; 74,6 (C_4 isomères $1/2\alpha$) ; 74,5 (C_4 isomères $1/2\beta$) ; 75,6 ; 75,7 ; 75,8 ; 76,1 ; 76,3 ; 76,3 ($C_{su\beta}$) ; 79,3 ($C(CH_3)_3$ Boc) ; 146,7 ; 146,9 ; 147,1 ; 147,7 (C_5 isomères $1/2\alpha/\beta$) ; 155,0 ($C=O$ Boc) ; 169,48 ; 169,5 ; 169,8 ; 169,9 ; 170,5 ; 170,5 ; 171,6 ; 171,7 ($C=O$ OAc isomères $1/2\alpha/\beta$).

Motif « Biot-spacer » (182)



Du chloroformate d'isobutyle (0,191 mL – 1,474 mmol) est ajouté à une solution de biotine (0,300 g – 1,228 mmol) et de tributylamine (0,351 mL – 1,474 mmol) dans 24 mL de DMF. Cette solution est ajoutée à 5°C sur une suspension d'acide 6-aminocaproïque (0,322 g – 2,456 mmol) dans 24 mL d'un mélange DMF/H₂O (1:1). Le produit brut est solubilisé à chaud dans un mélange éthanol/eau (1:1) puis cette solution est acidifiée par HCl 2N jusqu'à pH = 2 puis maintenue à 0°C pendant 12h. Le solide est filtré et lavé par de l'eau avant d'être séché sous vide pour donner le motif Biot-spacer **182** (0,351 g – 0,982 mmol) sous forme d'un solide blanc.

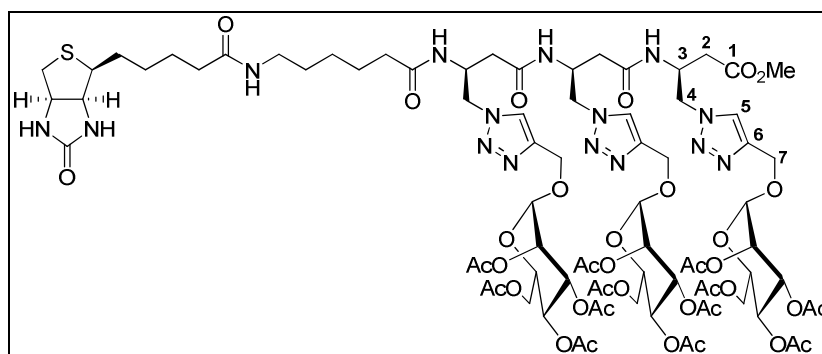
Rendement : 80%

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,42 (m, 12H, CH₂) ; 2,03 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₂) ; 2,18 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, CH₂) ; 2,57 (d, 1H, *J* = 12,4 Hz, CH₂S) ; 2,82 (dd, 1H, *J* = 4,9 Hz, *J* = 12,4 Hz, CH₂S) ; 3,00 (m, 2H, CH₂) ; 3,09 (m, 1H, CHS) ; 4,12 (m, 1H, CHN) ; 4,30 (m, 1H, CHN) ; 6,36 (se, 1H, NH) ; 6,43 (se, 1H, NH) ; 7,74 (t, 1H, NH) ; 12,0 (se, 1H, H_{acide}).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 24,1 (CH₂) ; 25,2 (CH₂) ; 25,9 (CH₂) ; 28,0 (CH₂) ; 28,1 (CH₂) ; 28,8 (CH₂) ; 33,5 (CH₂) ; 35,1 (CH₂) ; 38,1 (CH₂) ; 39,8 (CH₂S) ; 55,4 (CHS) ; 59,1 (CHN) ; 61,0 (CHN) ; 162,6 (N-(C=O)-N) ; 171,7 ((C=O)-NH) ; 174,4 (CO₂H).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸¹

Composé glycoconjugué (183)



C₈₀H₁₁₃N₁₅O₃₇S

1908,90 g/mol

Le composé **170** (0,050 g – 0,030 mmol) est déprotégé quantitativement en présence d'un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1:1 – 1,5 mL) en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc pour donner le sel de TFA correspondant.

CCM : R_f = 0,54 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

HR-MS : m/z calculé pour [C₆₆H₈₉F₃N₁₂O₃₆+2H]²⁺ 785,2836 ; trouvé 785,2846 (-1,3 ppm)

Le composé **183** est obtenu en appliquant la *procédure générale* de couplage peptidique *1* en utilisant :

- Sel d'acide trifluoroacétique obtenu ci-dessus (0,028 g – 0,016 mmol)
- Triéthylamine (0,027 mL – 0,020 mmol)
- Biot-spacer **182** (0,006 g – 0,018 mmol)
- HOBt.H₂O (0,003 g – 0,020 mmol)
- EDCi.HCl (0,004 g – 0,020 mmol)
- CH₂Cl₂/DMF (5:1 – 0,6 mL).

Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) pour donner le composé **183** (0,015 g – 0,008 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 50%

CCM : R_f = 0,31 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

PF : 129 – 131 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 51,5$ (c 0,445 – CHCl₃)

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3333 (N-H, ν) ; 3149 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2930 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1743 (C=O ester ; ν) ; 1678 (C=O carbamate – C=O amide, ν).

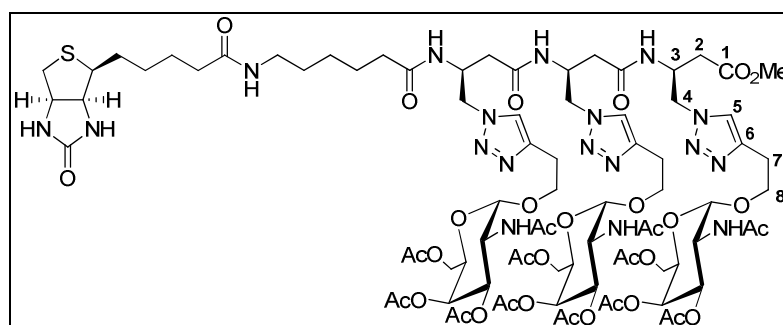
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{66}\text{H}_{89}\text{F}_3\text{N}_{12}\text{O}_{36}+2\text{H}]^{2+}$ 954,8644 ; trouvé 954,8649 (-0,5 ppm)

HPLC : t_R = 13,8 min ($\text{H}_2\text{O}/\text{Acétonitrile}$ 50:50)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 1,41 (m, 12H, CH_2) ; 1,89 ; 1,90 ; 1,97 ; 1,98 ; 2,05 ; 2,06 ; 2,07 (s, 36H, CH_3 OAc) ; 2,16 (m, 4H, CH_2) ; 2,36 (m, 4H, CH_2) ; 2,61 (d, 2H, J = 5,6 Hz, CH_2) ; 2,70 (d, 2H, J = 12,9 Hz, CH_2) ; 2,87 (dd, 1H, J = 3,5 Hz, J = 12,1 Hz, CH_2) ; 3,14 (m, 3H, CH_2) ; 3,63 (s, 3H, CH_3 CO_2Me) ; 4,03 (m, 6H, $3\text{H}_{5\text{su}}$, $3\text{H}_{6\text{su}}$) ; 4,24 (m, 3H, $\text{H}_{6'\text{su}}$) ; 4,53 (m, 11H, 3H_3 , 6H_4 , 2CHN) ; 4,76 (m, 6H, H_7) ; 4,89 (s, 3H, $\text{H}_{1\text{su}}$) ; 5,13 (m, 3H, $\text{H}_{2\text{su}}$) ; 5,22 (m, 6H, $3\text{H}_{3\text{su}}$, $3\text{H}_{4\text{su}}$) ; 5,78 (se, 1H, $\text{NH}_{\text{biotine}}$) ; 6,34 (se, 1H, $\text{NH}_{\text{biotine}}$) ; 6,72 (s, 1H, NH) ; 7,61 (se, 1H, NH) ; 7,77 (s, 1H, H_5) ; 7,80 (m, 1H, NH) ; 7,83 ; 7,88 (s, 2H, H_5).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 20,6 ; 20,7 ; 20,8 (CH_3 OAc) ; 24,8 ; 25,3 ; 25,8 ; 27,6 ; 27,7 ; 28,7 ; 35,4 ; 35,8 ; 36,0 ; 37,4 ; 37,8 ; 39,0 ; 40,6 (3C_2 , CH_2) ; 46,8 ; 47,0 ; 47,3 (3C_3) ; 52,1 (CH_3 CO_2Me) ; 52,3 ; 52,4 ; 52,6 (3C_4) ; 55,5 (CHS) ; 60,2 (CH) ; 60,3 ; 60,4 (3C_7) ; 61,7 (CH_2) ; 62,3 ($3\text{C}_{6\text{su}}$) ; 65,9 ($3\text{C}_{4\text{su}}$) ; 68,7 ($3\text{C}_{3\text{su}}$) ; 69,1 ; 69,3 ($3\text{C}_{2\text{su}}$, $3\text{C}_{5\text{su}}$) ; 96,4 ; 96,6 ($3\text{C}_{1\text{su}}$) ; 124,8 ; 125,0 ; 125,1 (3C_5) ; 142,9 ; 143,1 ; 143,4 (3C_6) ; 163,8 (C=O_{biotine}) ; 169,6 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,1 ; 170,7 ; 171,0 (3C_1 , C=O OAc, $2\text{C}=\text{O}_{\text{spacer}}$).

Composé glycoconjugué (184)



$\text{C}_{83}\text{H}_{122}\text{N}_{18}\text{O}_{34}\text{S}$

1948,02 g/mol

Le composé **170** (0,050 g – 0,030 mmol) est déprotégé quantitativement en présence d'un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (1:1 – 2,0 mL) selon la *procédure générale* de déprotection d'amine protégée sous forme de Boc.

HPLC : t_R = 7,00 min. ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

Une solution de sel d'acide trifluoroacétique obtenu ci-dessus (0,050 g – 0,029 mmol) et de Biot-spacer **182** (0,011 g – 0,032 mmol) dans 2 mL de DMF anhydre est traitée à température ambiante par de la DIPEA (0,006 mL – 0,035 mmol) et HATU (0,013 g – 0,035 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 5h. Les solvants sont évaporés sous vide et le résidu est solubilisé dans CH₂Cl₂. La solution est lavée par H₂O puis par une solution aqueuse d'acide citrique 5% et une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 80:20) pour donner le composé **184** (0,029 g – 0,015 mmol) sous forme d'un solide incolore.

Rendement : 50%

CCM : R_f = 0,63 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

PF : 129 – 132 °C

$[\alpha]_D^{23} = +76,3$ (c 0,320 – MeOH)

IR (pur) v (cm⁻¹) : 3293 ; 3257 (N-H, v) ; 3077 (Csp₂-H, v) ; 2953 ; 2926 ; 2857 (Csp₃-H, v) ; 1746 (C=O ester, v) ; 1688 (C=O carbamate, v) ; 1659 ; 1649 (C=O amide, v).

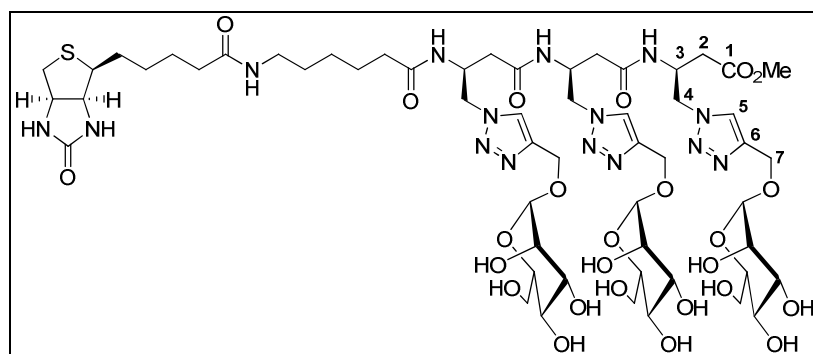
HR-MS : m/z calculé pour [C₈₃H₁₂₂N₁₈O₃₄S + 2H]²⁺ 974,9133 ; trouvé 974,9113 (2,1 ppm)

HPLC : t_R = 7,1 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,59 (m, 12H, CH₂ biotine) ; 1,95 ; 1,96 ; 1,98 ; 2,00 ; 2,02 ; 2,03 ; 2,13 ; 2,14 (s, 36H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,77 (m, 19H, 6H₂, 6H₈, CH₂S, CHS, CH₂) ; 3,66 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,71 (m, 5H, 3H₇, CH₂ biotine) ; 4,98 (m, 12H, 6H_{6su}, 3H_{5su}, 3H₇) ; 4,55 (m, 14H, 3H_{2su}, 3H₃, 6H₄, 2CHN) ; 4,91 (m, 3H, H_{1su}) ; 5,09 (m, 3H, H_{3su}) ; 5,33 (m, 3H, H_{4su}) ; 6,02 ; 6,47 ; 6,69 (se, 3H, NH_{biotine}) ; 7,04 (m, 3H, NHAc) ; 7,61 (se, 2H, H₅, NH) ; 7,79 (m, 3H, 2H₅, NH) ; 8,00 (m, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,7 ; 20,8 ; 23,0 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 24,6 ; 25,1 ; 25,7 ; 27,4 ; 27,5 ; 28,6 ; 29,6 ; 36,2 ; 37,9 ; 38,8 ; 40,7 ; 42,0 (3C₂, CH₂) ; 46,7 ; 47,2 ; 47,6 (3C₃, 3C_{2su}) ; 52,1 (CH₃ CO₂Me) ; 52,5 ; 52,6 (3C₄) ; 53,7 (3C₇) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 ; 61,6 (CHN) ; 62,0 ; 62,1 (3C_{6su}) ; 66,4 ; 67,1 (3C₈) ; 66,7 (3C_{5su}) ; 67,3 ; 67,4 (3C_{4su}) ; 68,4 ; 68,5 ; 68,7 (3C_{3su}) ; 97,6 ; 97,9 (3C_{1su}) ; 123,3 (3C₅) ; 144,7 (3C₆) ; 164,0 (C=O_{biotine}) ; 169,7 ; 170,1 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 (3C₁, C=O OAc, C=O NHAc, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (185)



1404,46 g/mol

Une solution de composé **183** (0,014 g – 0,007 mmol) dans 2 mL de MeOH anhydre est traitée par 0,250 mL d'une solution de MeONa (0,030 g dans 25 mL) pendant 1h30. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **185** (0,010 g – 0,007 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,25 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 158 – 160 °C

$[\alpha]_D^{21} = +40,7$ (c 0,150 – H₂O)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3302 (O-H, N-H, ν) ; 3082 (Csp₂-H, ν) ; 2930 ; 2874 (Csp₃-H, ν) ; 1670 ; 1653 (C=O ester, C=O amide, ν).

ESI-MS : m/z calculé pour [C₅₆H₈₉N₁₅O₂₅S + 2H]²⁺ 702,8 ; trouvé 702,9

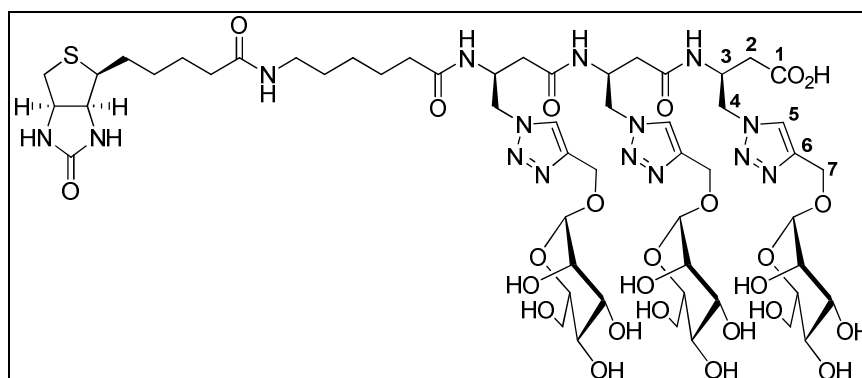
HPLC : t_R = 5,4 min (H₂O/MeOH 50:50)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,01 – 1,76 (m, 12H, CH₂) ; 2,09 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂) ; 2,23 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂) ; 2,34 – 2,56 (m, 4H, H₂) ; 2,65 (dd, 1H, J = 9,1 Hz, J = 16,7 Hz, H₂) ; 2,79 (m, 2H, CH₂) ; 2,97 (dd, 1H, J = 4,7 Hz, J = 12,8 Hz, H₂) ; 3,13 (m, 2H, CH₂) ; 3,31 (m, 1H, CHS) ; 3,65 (m, 9H, CH₃ CO₂Me, 6H_{su}) ; 3,76 (m, 6H, 3H_{6su}, 3H_{su}) ; 3,82 – 3,93 (m, 6H, 3H_{6su}, 3H_{2su}) ; 4,29 – 4,75 (m, 14H, 3H₃, 6H₄, 3H₇, 2CHN) ; 4,82 (m, 3H, H₇) ; 4,84 (s, 3H, H_{1su}) ; 8,05 ; 8,10 ; 8,11 (s, 3H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 35,5 ; 35,8 ; 37,3 ; 37,5 ; 39,0 ; 39,7 (3C₂, CH₂) ; 46,6 ; 47,0 (CH₂) ; 52,5 (3C₃) ; 52,5 (3C₄) ; 55,4 (CHS) ; 59,5 (3C₇) ; 60,2 (CHN) ; 60,9 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 66,7 (3C_{su}) ; 69,9 (3C_{2su}) ; 70,5 (3C_{su}) ; 73,0 (3C_{su}) ; 99,2 (3C_{1su}) ; 125,7 ; 125,9

(3C₅) ; 143,9 (3C₆) ; 165,3 (C=O_{biotine}) ; 171,0 ; 171,3 ; 172,5 ; 172,68 ; 172,7 ; 176,1 (3C₁, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (186)



C₅₅H₈₇N₁₅O₂₅S

1390,43 g/mol

Une solution de composé **185** (0,006 g – 0,004 mmol) dans 0,5 mL de MeOH et 0,004 mL d'eau est traitée par K₂CO₃ (0,0006 mg – 0,005 mmol) pendant 30h. Le milieu est acidifié avec précaution jusqu'à pH = 6 avec de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **186** (0,006 g – 0,004 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,10 (n-propanol/H₂O 70:30)

HR-MS : m/z calculé pour [C₅₅H₈₇N₁₅O₂₅S+2H]²⁺ 695,7920 ; trouvé 695,7932 (1,78 ppm)

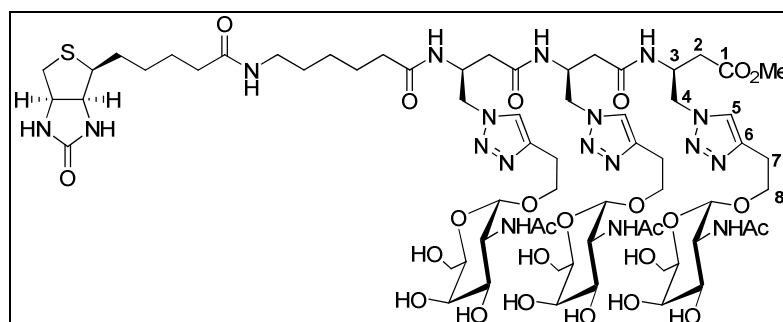
HPLC : t_R = 4,9 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,05 – 1,76 (m, 12H, CH₂) ; 2,10 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 2,25 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂) ; 2,36 – 2,56 (m, 4H, H₂) ; 2,62 (dd, 1H, J = 8,6 Hz, J = 16,6 Hz, 1H₂) ; 2,74 – 2,84 (m, 2H, CH₂) ; 2,99 (dd, 1H, J = 5,0 Hz, J = 13,1 Hz, H₂) ; 3,08 – 3,24 (m, 2H, CH₂) ; 3,32 (m, 1H, CHS) ; 3,65 (m, 6H, H_{su}) ; 3,79 (m, 6H, 3H_{6su}, 3H_{su}) ; 3,83 – 3,96 (m, 6H, 3H_{6su}, 3H_{2su}) ; 4,32 – 4,74 (m, 14H, 3H₃, 6H₄, 3H₇, 2CHN) ; 4,82 (m, 3H, H₇) ; 4,95 (s, 3H, H_{1su}) ; 8,06 ; 8,10 ; 8,13 (s, 3H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 24,9 ; 25,2 ; 25,4 ; 27,6 ; 27,8 ; 27,9 (CH₂) ; 35,5 ; 37,3 ; 37,5 ; 39,0 ; 39,7 (3C₂ CH₂) ; 45,4 ; 46,6 ; 46,8 ; 47,0 ; 48,9 (CH₂) ; 52,6 ; 52,7 ; 53,2 (3C₃ 3C₄) ; 55,4 (CHS) ; 59,5 (3C₇) ; 60,2 (CHN) ; 60,9 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 66,7 (3C_{su}) ;

69,9 (3C_{2su}) ; 70,5 (3C_{su}) ; 73,0 (3C_{su}) ; 99,2 (3C_{1su}) ; 125,7 ; 125,8 ; 125,8 (3C₅) ; 143,5 ; 143,7 (3C₆) ; 166,2 (C=O_{biotine}) ; 171,0 ; 174,1 ; 176,2 ; 176,4 (3C₁, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (187)



1569,69 g/mol

Une solution de composé **183** (0,020 g – 0,010 mmol) dans 3 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 mg dans 25 mL). Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **187** (0,015 g – 0,010 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,20 (n-propanol/H₂O 70:30)

$[\alpha]_D^{22} = -35,41$ (c 0,37 – H₂O)

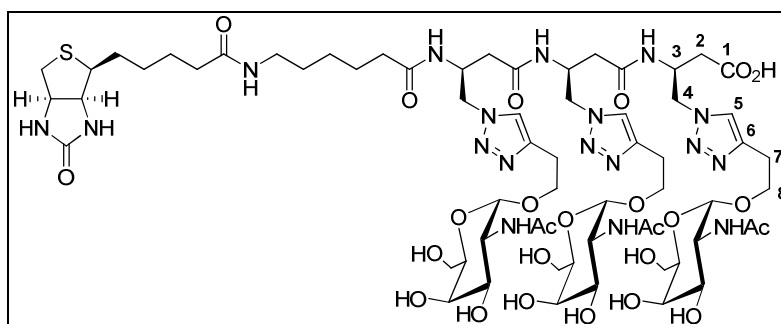
HR-MS : m/z calculé pour [C₆₅H₁₀₄N₁₈O₂₅S+2H]²⁺ 785,3630 ; trouvé 785,3643 (1,8 ppm)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,28 – 1,77 (m, 12H, CH₂) ; 1,99 ; 2,00 (s, 9H, CH₃ NHAc) ; 2,08 (t, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂) ; 2,23 (t, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂) ; 2,46 (m, 4H, 4H₂) ; 2,63 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 8,8 Hz, J_{gem} = 16,5 Hz, H₂) ; 2,78 (m, 2H, H₂, CH₂) ; 2,98 (m, 7H, CH₂) ; 3,13 (m, 2H, CH₂) ; 3,31 (dd, 1H, J = 5,2 Hz, J = 9,5 Hz, CHS) ; 3,67 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,72 (m, 12H, 6H_{6su}, 3H_{su}, 3H₈) ; 3,83 (m, 3H, H_{su}) ; 3,91 (m, 6H, 3H₈, 3H_{su}) ; 4,12 (dt, 3H, J = 3,4 Hz, J = 11,0 Hz, H_{2su}) ; 4,25 – 4,73 (m, 11H, 3H₃, 2CHN, 6H₇) ; 4,87 (m, 3H, H_{1su}) ; 7,83 ; 7,89 ; 7,91 (s, 3H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 22,0 (CH₃ NHAc) ; 24,9 ; 25,1 ; 25,2 ; 25,4 ; 27,7 ; 27,9 ; 28,9 ; 29,1 (CH₂) ; 35,5 ; 35,9 ; 37,0 ; 37,7 ; 39,0 ; 39,7 ; 42,5 (3C₂, CH₂) ; 46,7 ; 47,0 (3C₃) ; 49,9 ; 50,2 (3C_{2su}) ; 52,4 (CH₃ CO₂Me) ; 52,6 (CH₂) ; 55,5 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 61,1

(3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 66,5 ; 66,6 (3C₈) ; 67,7 ; 68,4 70,9 (6C_{su}) ; 96,8 (3C_{1su}) ; 124,0 ; 124,1 ; 124,2 (3C₅) ; 145,4 ; 145,6 ; 145,7 (3C₆) ; 165,3 (C=O_{biotine}) ; 170,9 ; 172,5 ; 174,3 ; 176,0 ; 176,5 ; (3C₁, 2C=O_{amide}).

Composé glycoconjugué (188)



1555,67 g/mol

Une solution de composé **187** (0,006 g – 0,004 mmol) dans 0,5 mL de MeOH et 0,004 mL d'eau est traitée par K₂CO₃ (0,6 mg – 0,005 mmol) pendant 30h. Le milieu est acidifié avec précaution jusqu'à pH = 6 avec de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **188** (0,006 g – 0,00' mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,05 (n-propanol/H₂O 70:30)

HR-MS : m/z calculé pour [C₆₄H₁₀₂N₁₈O₂₅S+2H]²⁺ 778,3550 ; trouvé 778,3565 (1,79 ppm)

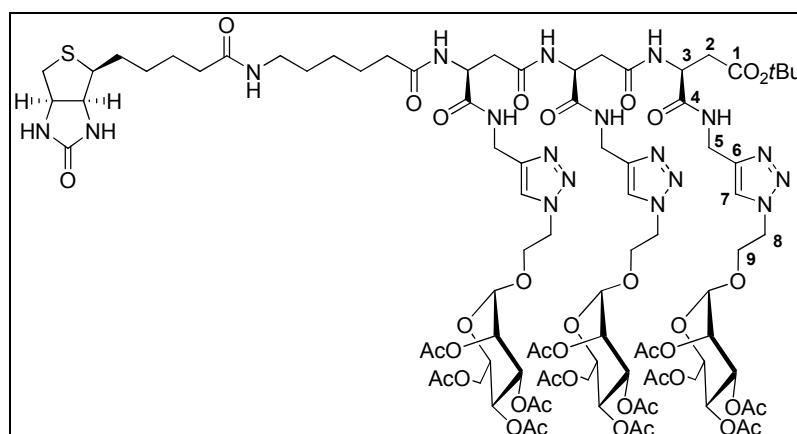
HPLC : t_R = 5,2 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,08 – 1,21 (m, 2H, CH₂) ; 1,35 – 1,50 (m, 6H, CH₂) ; 1,51 – 1,82 (m, 4H, CH₂) ; 2,00 (s, 9H, CH₃ NHAc) ; 2,09 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 2,21 – 2,29 (m, 2H, CH₂) ; 2,43 – 2,52 (m, 4H, H₂) ; 2,62 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 16,6 Hz, H₂) ; 2,80 (m, 2H, H₂, CH₂) ; 2,95 – 3,08 (m, 7H, CH₂) ; 3,15 (m, 2H, CH₂) ; 3,33 (dd, 1H, J = 4,6 Hz, J = 9,2 Hz, CHS) ; 3,69 – 3,81 (m, 12H, 6H_{6su}, 3H_{su}, 3H₈) ; 3,81 – 3,88 (m, 3H, H_{su}) ; 3,89 – 3,99 (m, 6H, 3H₈, 3H_{su}) ; 4,13 (dt, 3H, J = 3,6 Hz, J = 11,0 Hz, H_{2su}) ; 4,25 ; 4,27 ; 4,75 (m, 11H, 3H₃, 2CHN, 6H₇) ; 4,88 (m, 3H, H_{1su}) ; 7,86 ; 7,90 ; 7,94 (s, 3H, H₅).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 21,9 (CH₃ NHAc) ; 24,9 ; 25,0 ; 25,2 ; 25,5 ; 27,7 ; 27,9 ; 28,0 ; (CH₂) ; 35,5 ; 35,9 ; 39,0 ; 39,7 (3C₂, CH₂) ; 46,7 ; 47,0 (3C₃) ; 49,9 (3C_{2su}) ; 52,6

(CH₂) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 61,1 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 66,5 (3C₈) ; 67,7 ; 68,4 ; 70,9 (6C_{su}) ; 96,8 (3C_{1su}) ; 124,1 ; 124,2 ; 124,2 (3C₅) ; 143,5 (3C₆) ; 165,3 (C=O_{biotine}) ; 171,0 ; 173,8 ; 174,4 ; 176,0 (3C₁, 2C=O_{amide}).

Composé glycoconjugué (190)



C₈₉H₁₂₈N₁₈O₄₀S

2122,13 g/mol

Une solution d'amine **156** (0,100 g – 0,056 mmol) et de Biot-spacer **182** (0,022 g – 0,062 mmol) dans 3 mL de DMF anhydre est traitée à température ambiante par de la DIPEA (0,012 mL – 0,067 mmol) et HATU (0,026 g – 0,067 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 5h. La solution est lavée par H₂O puis par une solution aqueuse d'acide citrique 5% et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 90:10 à 85:15) pour donner le composé **190** (0,083 g – 0,040 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 70%

CCM : R_f = 0,28 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 109 – 112 °C

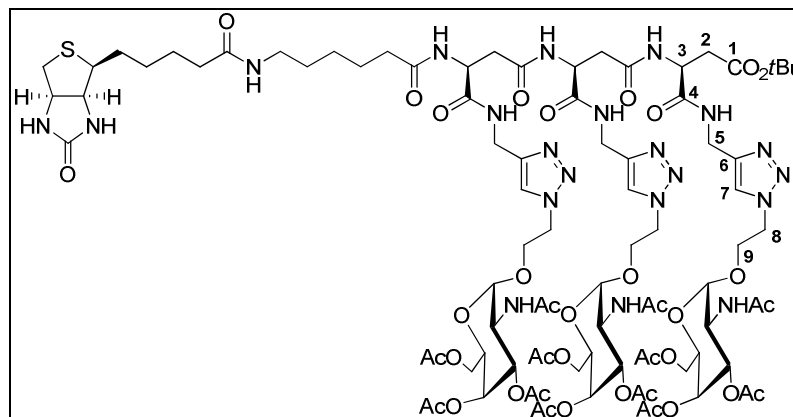
$[\alpha]_D^{24} = + 24,8$ (c 0,335 – MeOH)

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3311 (N-H, ν) ; 3066 (Csp₂-H, ν) ; 2945 ; 2882 (Csp₃-H, ν) ; 1748 (C=O ester ; ν) ; 1658 (C=O carbamate, C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₈₉H₁₂₈N₁₈O₄₀S+2H]²⁺ 1061,4200 ; trouvé 1061,4216 (-1,5 ppm)

HPLC : $t_R = 9,3$ min (H₂O/MeOH 30:70)

Composé glycoconjugué (191)



C₈₉H₁₃₁N₂₁O₃₇S

2119,18 g/mol

Le composé **146** est déprotégé en appliquant la procédure générale de déprotection d'amine protégée sous forme de Fmoc en utilisant :

- **146** (0,060 g – 0,030 mmol)
- Et₂NH/CH₃CN (1 : 2 – 0,210 mL)

Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) pour donner l'amine libre **189** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 49%

CCM : R_f = 0,31 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

Une solution d'amine **189** (0,024 g – 0,014 mmol) et de Biot-spacer **182** (0,005 g – 0,015 mmol) dans 0,7 mL de DMF anhydre est traitée à température ambiante par de la DIPEA (0,0002 mL – 0,016 mmol) et HATU (0,016 g – 0,006 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 5h. La solution est lavée par H₂O puis par une solution aqueuse d'acide citrique 5% et de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 90:10 à 85:15) pour donner le composé **191** (0,033 g – 0,016 mmol) sous forme d'un solide incolore.

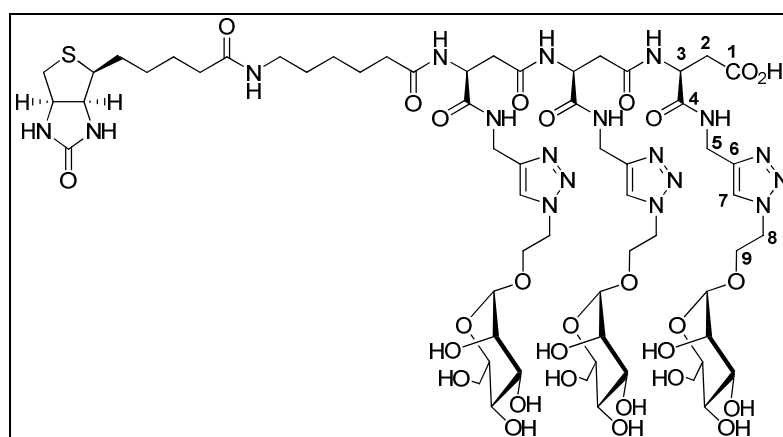
Rendement : 52%

CCM : R_f = 0,30 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,32 – 1,76 (m, 12H, CH₂) ; 1,94 ; 1,95 ; 2,03 ; 2,12 (s, 36H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,16 – 2,30 (m, 4H, CH₂) ; 2,57 (dd, 2H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 14,4 Hz, CH₂) ; 2,68 (m, 2H, CH₂) ; 2,82 (m, 2H, CH₂) ; 2,93 (dd, 1H, *J* = 5,0 Hz, *J* = 12,7 Hz, CH₂) ; 3,06 (m, 1H, CH₂) ; 3,17 (m, 3H, CHS, CH₂) ; 3,83 – 4,15 (m, 15H, 6H₉, 3H_{5su}, 6H_{6su}) ; 4,29 – 4,48 (m, 9H, 6H₅, 3H_{2su}) ; 4,49 – 4,75 (m, 10H, 2H₃, 6H₈, 2CHN) ; 4,84 (m, 1H, H₃) ; 4,92 (m, 3H, H_{1su}) ; 5,07 (dd, 1H, *J* = 3,1 Hz, *J* = 11,6 Hz, H_{3su}) ; 5,12 (dd, 2H, *J* = 2,9 Hz, *J* = 11,5 Hz, H_{3su}) ; 5,36 (m, 3H, H_{4su}) ; 7,88 ; 7,91 ; 7,92 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 20,6 ; 20,8 ; 22,8 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 26,3 ; 26,9 ; 27,0 ; 27,6 ; 28,2 (CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,6 ; 30,2 ; 30,8 (CH₂) ; 35,9 ; 36,1 ; 36,7 ; 36,8 ; 36,9 ; 38,1 ; 38,8 ; 40,3 (3C₂, CH₂) ; 49,0 (3C_{2su}) ; 51,1 ; 51,2 ; 51,3 (3C₃) ; 52,0 (3C₃) ; 57,1 (CHS) ; 53,1 ; 63,5 (3C_{6su}) ; 67,4 ; 67,5 ; 67,7 (3C₉) ; 68,1 (3C_{5su}) ; 68,7 (3C_{4su}) ; 69,6 (3C_{3su}) ; 82,5 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 98,7 ; 98,8 ; 98,9 (3C_{1su}) ; 125,1 (3C₇) ; 166,8 (C=O_{biotine}) ; 171,5 ; 172,0 ; 172,1 ; 172,2 ; 172,3 ; 173,1 ; 173,3 ; 173,7 ; 176,0 ; 176,1 (3C₁, 3C₄, C=O OAc, C=O NHAc, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (192)



C₆₁H₉₆N₁₈O₂₈S

1561,58 g/mol

Le composé **190** (0,010 g – 0,005 mmol) est traité par 1 mL d'un mélange TFA/CH₂Cl₂ pendant 3h, selon la *procédure générale* de déprotection d'acide protégé sous forme d'ester *tert*-butylique. Le milieu est concentré sous vide. Le résidu est solubilisé dans 1 mL de MeOH anhydre et traité par une solution de MeONa (*qsp* pH = 8) pendant 5h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est

concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **192** (0,008 g – 0,005 mmol) sous forme d'un solide blanc.

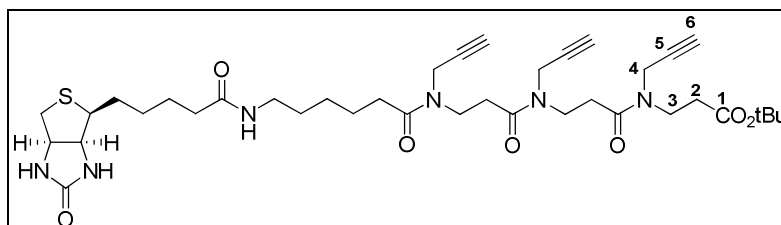
Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,65 (n-propanol/H₂O 70:30)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,12 – 1,72 (m, 12H, CH₂) ; 2,17 (m, 4H, 4H₂) ; 2,56 – 3,15 (m, 13H, 2H₂, 3H_{5su}, 4CH₂) ; 3,24 (m, 1H, CHS) ; 3,45 – 3,71 (m, 12H, 6H_{6su}, 3H_{4su}, 3H_{3su}) ; 3,78 (s, 3H, 3H_{2su}) ; 3,83 (m, 3H, 3H₉) ; 3,99 (m, 3H, 3H_{9'}) ; 4,33 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, J = 7,9 Hz, CHN) ; 4,38 (d, 6H, J = 13,5 Hz, 6H₅) ; 4,52 (dd, 1H, J = 4,8 Hz, J = 8,0 Hz, CHN) ; 4,55 (m, 6H, 6H₈) ; 4,65 (q, 3H, J = 7,2 Hz, H₃) ; 4,70 (m, 3H, H_{1su}) ; 7,82 – 7,84 (s, 3H, H₇).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 24,8 ; 25,2 ; 25,5 ; 27,6 ; 27,8 ; 28,0 (CH₂) ; 34,6 ; 34,7 (3C₅) ; 35,3 ; 35,5 (3C₂) ; 36,9 ; 39,0 ; 39,7 (CH₂) ; 50,1 (3C₈) ; 50,1 ; 50,5 ; 50,6 (3C₃) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 60,7 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 65,4 (3C₉) ; 66,4 (3C_{4su}) ; 69,9 (3C_{2su}) ; 70,4 (3C_{3su}) ; 72,8 (3C_{5su}) ; 99,5 (3C_{1su}) ; 124,4 (3C₇) ; 144,6 (3C₆) ; 165,0 (C=O_{biotine}) ; 171,7 ; 171,8 ; 172,3 ; 172,5 ; 172,9 ; 174,0 ; 174,5 ; 176,5 ; 176,8 (3C₁, 3C₄, 2C=O_{spacer}).

Composé (195)



C₃₈H₅₆N₆O₇S

740,95 g/mol

Une solution de trimère **160** (0,100 g – 0,249 mmol) et de Biot-spacer **182** (0,098 g – 0,274 mmol) dans 3,3 mL d'un mélange DMF/CH₂Cl₂ (4:1) anhydre est traitée à température ambiante par de la DIPEA (0,052 mL – 0,299 mmol) et HATU (0,114 g – 0,299 mmol). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 8h. Les solvants sont évaporés sous vide et le résidu est solubilisé dans CH₂Cl₂. La solution est lavée par H₂O puis par une solution aqueuse d'acide citrique 5% et de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de

silice (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) pour donner le composé **195** (0,151 g – 0,204 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 82%

CCM : R_f = 0,30 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 79 – 82 °C

$[\alpha]_D^{22} = +28,1$ (c 0,700 – MeOH)

IR (pur) v (cm⁻¹) : 3293 ; 3279 ; 3232 (N-H, v) ; 3098 (C_{sp2}-H, v) ; 2930 ; 2857 (C_{sp3}-H, v) ; 2115 (C≡C, v) ; 1703 ; 1641 (C=O ester, C=O amide, v).

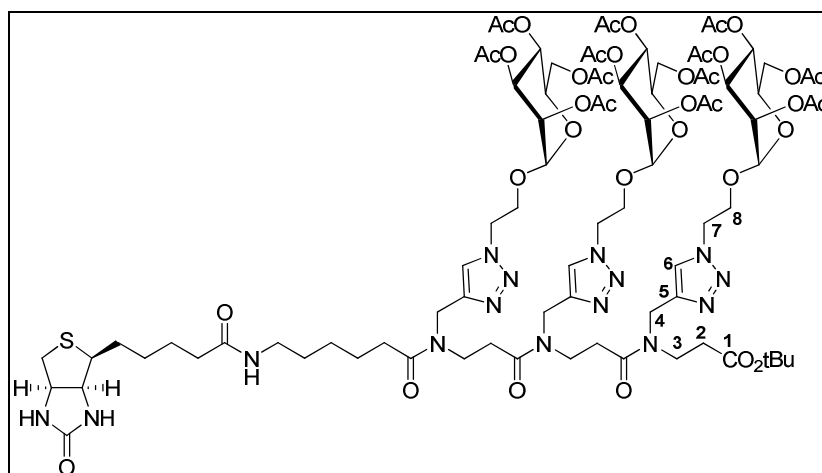
HR-MS : m/z calculé pour [C₃₈H₅₆N₆O₇S]²⁺ 741,4009 ; trouvé 741,4006 (+0,4 ppm)

HPLC : t_R = 9,6 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1,45 ; 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,37 – 1,79 (m, 12H, CH₂) ; 2,20 (t, 2H, J = 7,4 Hz, CH₂) ; 2,48 (m, 2H, J = 7,7 Hz, CH₂) ; 2,55 (t, 1H, J = 7,1 Hz, CH₂) ; 2,65 (m, 3H, CH₂) ; 2,77 – 2,96 (m, 9H, 3H₆, CH₂S, CH₂) ; 3,19 (m, 3H, CHS, CH₂) ; 3,62 – 3,83 (m, 6H, H₄) ; 4,24 (m, 6H, H₃) ; 4,31 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, J = 7,9 Hz, CHN) ; 4,50 (dd, 1H, J = 4,4 Hz, J = 7,8 Hz, CHN) ; 7,95 (m, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 27,7 (CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,6 ; 29,8 ; 30,3 ; 32,4 ; 32,5 ; 32,7 ; 32,8 ; 33,0 ; 33,1 ; 33,8 ; 34,1 ; 34,8 ; 34,9 ; 35,1 ; 35,2 ; 35,3 ; 35,5 ; 36,9 ; (CH₂) ; 39,2 ; 39,5 ; 40,2 ; 41,1 (CH₂) ; 44,0 ; 44,2 ; 44,4 ; 44,6 ; 44,6 ; 44,7 ; 44,8 ; 44,9 ; 45,0 (CH₂) ; 57,1 (CHS) ; 61,6 ; 63,4 (2CHN) ; 73,1 ; 73,2 ; 73,3 ; 73,4 ; 74,2 ; 74,4 ; 74,5 ; 74,6 (3C₆) ; 79,9 ; 80,0 ; 80,1 ; 80,3 ; 80,5 ; 82,0 ; 82,3 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 166,1 (C=O_{biotine}) ; 172,2 ; 172,3 ; 172,5 ; 172,6 ; 172,7 ; 172,8 ; 173,0 ; 173,0 ; 173,1 ; 173,4 ; 173,5 ; 175,2 ; 175,6 ; 176,0 (3C₁, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (194)



1993,06 g/mol

Le composé **194** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Composé **195** (0,050 g – 0,068 mmol)
- Sucre **114** (0,085 g – 0,204 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO_4 0,1M aq. (0,109 mL – 0,011 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,326 mL – 0,033 mmol – 0,48 éq.)
- DMF (1,2 mL).

Après 6h de réaction à température ambiante, le DMF est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans CH_2Cl_2 est lavé par H_2O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl . La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10) pour donner le composé **194** (0,087 g – 0,044 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 64%

CCM : $R_f = 0,53$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15)

PF : 94 – 97 °C

$[\alpha]_D^{23} = +39,7$ (c 0,315 – H_2O)

IR (pur) ν (cm^{-1}) : 3306 (N-H, ν) ; 3121 ($\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, ν) ; 2942 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, ν) ; 1748 (C=O ester, ν) ; 1703 (C=O carbamate, ν) ; 1632 (C=O amide, ν).

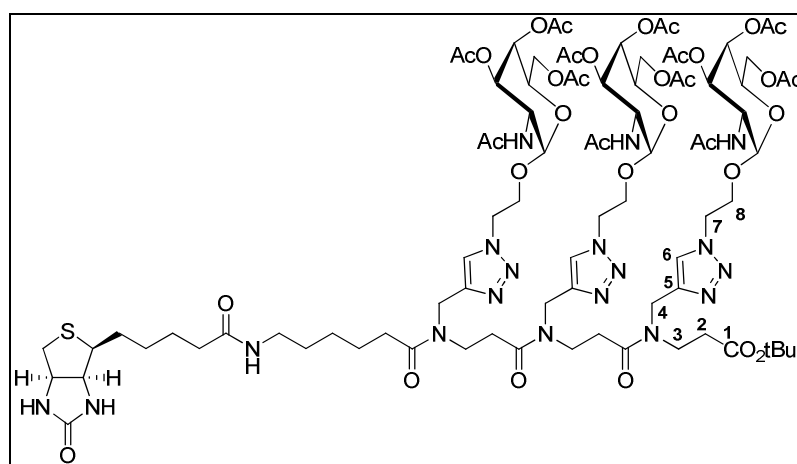
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{86}\text{H}_{125}\text{N}_{15}\text{O}_{37}\text{S} + 2\text{H}]^{2+}$ 996,9114 ; trouvé 996,9133 (-1,9 ppm)

HPLC : $t_R = 11,5$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1,43 ; 1,44 ; 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 1,36 – 1,78 (m, 12H, CH₂) ; 1,95 ; 1,95 ; 2,04 ; 2,05 ; 2,06 ; 2,12 (s, 36H, CH₃ OAc) ; 2,20 (t, 2H, *J* = 7,4 Hz, CH₂) ; 2,49 – 3,00 (m, 10H, CH₂S, 6H₂, CH₂) ; 3,19 (m, 3H, CHS, CH₂) ; 3,51 – 3,86 (m, 9H, 3H_{5su}, 6H₈) ; 3,90 – 4,27 (m, 12H, 6H_{6su}, 6H₃) ; 4,31 (dd, 1H, *J* = 4,5 Hz, *J* = 7,8 Hz, CHN) ; 4,49 (dd, 1H, *J* = 4,9 Hz, *J* = 7,6 Hz, CHN) ; 4,69 (m, 12H, 6H₄, 6H₇) ; 4,84 (m, 3H, H_{1su}) ; 5,17 (m, 9H, 3H_{2su}, 3H_{3su}, 3H_{4su}) ; 7,93 (m, 2H, NH, H₆) ; 8,12 (m, 2H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 20,7 ; 20,8 ; 20,8 (CH₃ OAc) ; 26,0 ; 26,1 ; 27,0 ; 27,7 ; 27,8 (CH₂) ; 28,5 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 29,5 ; 29,8 ; 30,3 ; 32,3 ; 32,8 ; 33,5 ; 33,8 ; 34,3 ; 34,6 ; 35,3 ; 35,4 (3C₂, CH₂) ; 36,9 ; 40,3 ; 41,1 ; 43,6 ; 43,7 ; 44,4 ; 44,6 ; 44,7 ; 44,9 ; 45,5 (CH₂) ; 51,0 ; 51,1 (3C₄) ; 57,0 (CHS) ; 61,3 (CHN) ; 63,5 (3C_{6su}, CHN) ; 66,9 (3C_{4su}) ; 67,4 (3C₈) ; 70,1 ; 70,2 (3C_{3su}) ; 70,5 ; 70,6 (3C_{2su}, 3C_{5su}) ; 81,9 ; 82,2 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 98,7 (3C_{1su}) ; 125,5 ; 125,6 (3C₆) ; 145,1 (3C₅) ; 166,0 (C=O_{biotine}) ; 171,5 ; 172,3 ; 172,8 ; 172,9 ; 173,5 ; 173,6 ; 175,5 ; 175,6 ; 175,7 (3C₁, C=O OAc, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (196)



C₈₆H₁₂₈N₁₈O₃₄S

1990,10 g/mol

Le composé **196** est obtenu en appliquant la procédure générale de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant :

- Composé **195** (0,061 g – 0,082 mmol)
- Sucre **116** (0,103 g – 0,247 mmol – 3,0 éq.)
- CuSO₄ 0,1M aq. (0,131 mL – 0,013 mmol – 0,16 éq.)
- Acide ascorbique 0,1M aq. (0,395 mL – 0,039 mmol – 0,48 éq.)

- DMF (1,1 mL).

Après 1h de réaction, le DMF est évaporé sous vide et le résidu solubilisé dans CH₂Cl₂ est lavé par H₂O (4x) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de 90:10 à 80:20) pour donner le composé **196** (0,119 g – 0,060 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 73%

CCM : R_f = 0,45 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20)

PF : 122 – 125 °C

$[\alpha]_D^{23} = +76,3$ (c 0,320 – MeOH)

IR (pur) v (cm⁻¹) : 3390 ; 3279 (N-H, v) ; 3072 (Csp²-H, v) ; 2938 (Csp³-H, v) ; 1746 (C=O ester, v) ; 1697 ; 1639 (C=O amide, v).

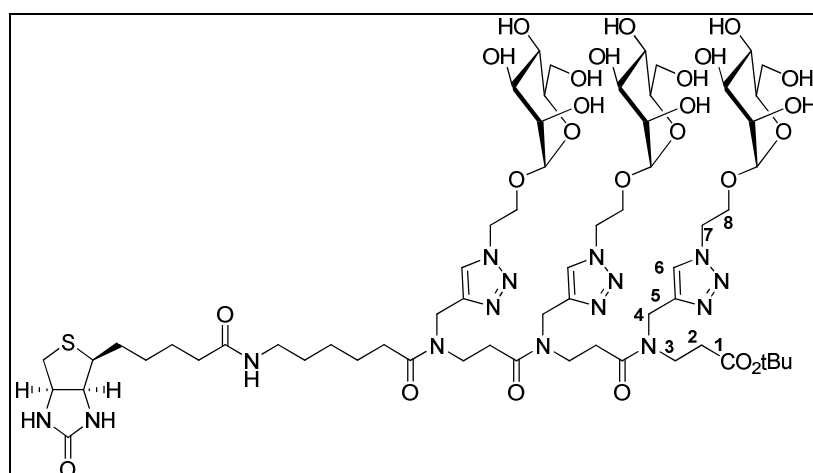
HR-MS : m/z calculé pour [C₈₆H₁₂₈N₁₈O₃₄S+2H]²⁺ 995,4353 ; trouvé 995,4346 (0,7 ppm)

HPLC : t_R = 8,1 min. (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 1,43 ; 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,31 – 1,81 (m, 12H, CH₂) ; 1,94 ; 1,96 ; 2,03 ; 2,12 (s, 36H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 2,20 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂) ; 2,43 – 3,07 (m, 10H, CH₂S, 4CH₂) ; 3,18 (m, 3H, CHS, CH₂) ; 3,52 – 4,04 (m, 15H, 3H_{5su}, 3H_{6su}, 3H₈, 6H₃) ; 4,10 (m, 6H, 3H_{6su}, 3H₈) ; 4,32 (dd, 1H, J = 4,6 Hz, J = 7,4 Hz, CHN) ; 4,42 (d, 3H, J = 11,4 Hz, H_{2su}) ; 4,50 (dd, 1H, J = 5,0 Hz, J = 7,2 Hz, CHN) ; 4,55 – 4,77 (m, 12H, 6H₄, 6H₇) ; 4,93 (m, 3H, H_{1su}) ; 5,05 (d, 3H, J = 11,3 Hz, H_{3su}) ; 5,35 (d, 3H, J = 11,1 Hz, H_{4su}) ; 7,88 ; 8,00 ; 8,11 ; 8,14 (m, 3H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 20,6 ; 20,8 ; 20,8 ; 22,8 (CH₃ OAc, CH₃ NHAc) ; 26,0 ; 26,1 ; 26,9 (CH₂) ; 28,5 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,5 ; 29,8 ; 30,2 (CH₂) ; 32,2 ; 32,7 ; 33,5 ; 33,9 ; 34,3 ; 34,6 ; 35,3 ; 35,4 (CH₂) 36,9 (CH₂) ; 40,2 ; 40,3 ; 41,1 ; 41,7 ; 42,0 (CH₂) ; 43,6 ; 44,1 ; 44,2 ; 44,4 ; 44,5 ; 44,7 ; 44,8 ; 44,9 ; 45,0 ; 45,3 ; 45,4 ; 45,6 (CH₂) ; 48,8 (3C_{2su}) ; 51,1 (3C₄) ; 61,6 (CHN) ; 63,0 ; 63,1 (3C_{6su}) ; 63,3 (CHN) ; 67,6 (3C₈) ; 68,1 (3C_{5su}) ; 68,6 ; 68,7 (3C_{4su}) ; 69,5 (3C_{3su}) ; 98,8 ; 98,9 (3C_{1su}) ; 125,1 (3C₆) ; 144,4 (3C₅) ; 166,0 (C=O_{biotine}) ; 171,8 ; 172,0 ; 172,1 ; 172,8 ; 172,9 ; 173,4 ; 173,5 ; 175,6 ; 175,8 ; 175,9 (3C₁, C=O OAc, C=O NHAc, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (197)



1488,62 g/mol

Une solution de composé **194** (0,050 g – 0,025 mmol) dans 7,1 mL de MeOH anhydre est traitée par 0,968 mL d'une solution de MeONa (0,033 g dans 25 mL) pendant 6h. Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **197** (0,037 g – 0,025 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif.

CCM : R_f = 0,19 (n-propanol/H₂O 70:30)

PF : 132 – 135 °C

$$[\alpha]_D^{22} = + 24,7 \text{ (c 0,310 – H}_2\text{O)}$$

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3296 (O-H, N-H, ν) ; 3075 (Csp²-H, ν) ; 2926 ; 2858 (Csp³-H, ν) ; 1651 (C=O ester C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₆₂H₁₀₁N₁₅O₂₅S+2H]²⁺ 744,8480 ; trouvé 744,8467 (1,7 ppm)

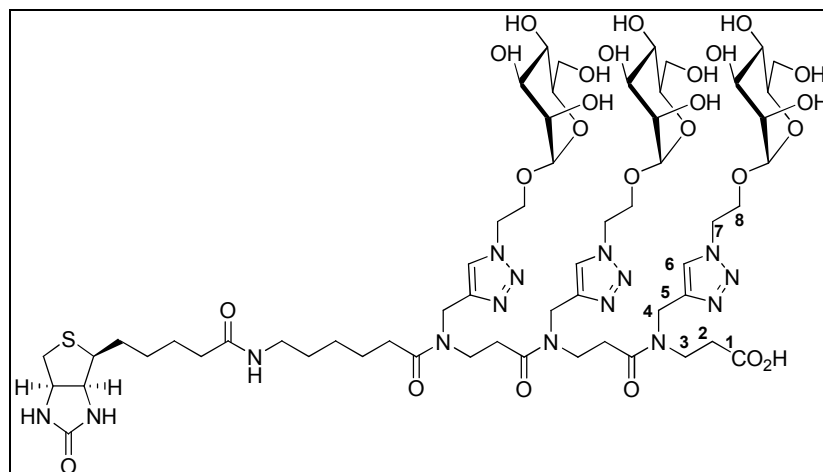
HPLC : t_R = 5,9 min. (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,36 ; 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,22 – 1,79 (m, 12H, CH₂) ; 2,24 (t, 2H, J = 6,9 Hz, CH₂) ; 2,49 (m, 3H, CH₂) ; 2,59 – 3,34 (m, 13H, CH₂) ; 3,54 – 4,00 (m, 24H, 6H_{6su}, 12H_{su}, 3H₈, 6H₃) ; 4,10 (m, 3H, H₈) ; 4,41 (dd, 1H, J = 4,5 Hz, J = 7,6 Hz, CHN) ; 4,52 – 4,76 (m, 13H, CHN, 6H₄, 6H₇) ; 4,79 (m, 3H, H_{1su}) ; 7,92 ; 7,94 ; 7,98 ; 8,10 (s, 3H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 24,8 ; 25,2 ; 25,6 ; 27,7 ; 27,9 ; 28,0 (CH₂) ; 29,6 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 33,6 ; 34,4 ; 34,6 ; 34,7 ; 35,3 ; 35,5 ; 36,4 ; 36,9 ; 39,1 ; 39,7 (CH₂) ;

50,1 (CH₂) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 60,7 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 65,4 (3C₈) ; 66,4 ; 69,9 ; 70,5 ; 72,8 (6C_{su}) ; 95,5 (3C_{1su}) ; 124,4 ; 124,5 (3C₆) ; 144,6 ; 144,6 (3C₅) ; 165,3 (C=O_{biotine}) ; 171,3 ; 171,7 ; 171,3 ; 171,6 ; 171,7 ; 171,8 ; 172,2 ; 172,3 ; 172,5 ; 172,6 ; 176,7 ; 176,8 ; 176,9 ; 177,0 ; 177,5 (3C₁, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (198)



C₅₈H₉₃N₁₅O₂₅S

1432,51 g/mol

Une solution de composé **197** (0,010 g – 0,007 mmol) est traitée par un mélange TFA/CH₂Cl₂ 1:1 (0,5 mL) pendant 1h30, selon la *procédure générale* de déprotection d'acide protégé sous forme d'ester *tert*-butylique. Le TFA est évaporé sous vide par co-évaporations répétées au CH₂Cl₂. On obtient l'acide **198** (0,010 g – 0,007 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif.

CCM : R_f = 0,10 (n-propanol/H₂O 70:30)

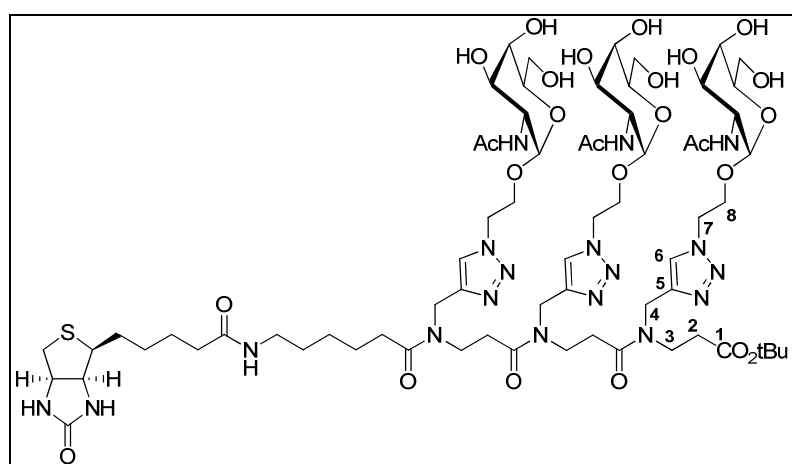
HR-MS : m/z calculé pour [C₅₈H₉₃N₁₅O₂₅S+2H]²⁺ 716,8130 ; trouvé 716,8167 (5,35 ppm)

HPLC : t_R = 4,9 min. (H₂O/MeOH 30: 70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,33 – 1,77 (m, 12H, CH₂) ; 2,18 – 2,32 (m, 4H, CH₂) ; 2,63 – 3,25 (m, 16H, CH₂) ; 3,32 (m, 1H, CHS) ; 3,50 – 3,98 (m, 24H, 6H_{6su}, 12H_{su}, 6H₃) ; 4,02 – 4,14 (m, 3H, 3H₈) ; 4,42 (dd, 1H, J = 4,5 Hz, J = 7,8 Hz, CHN) ; 4,46 (m, 3H, H₈) ; 4,54 – 4,86 (m, 10H, CHN, 6H₄, 6H₇, 3H_{1su}) ; 7,93 ; 7,94 ; 7,98 ; 8,03 ; 8,05 ; 8,08 ; 8,10 (s, 3H, H₆).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ (ppm) : 25,2 ; 25,5 ; 27,6 ; 27,8 ; 28,0 (CH_2) ; 34,5 ; 34,6 ; 34,7 ; 35,3 ; 35,5 ; 39,0 ; 39,7 ; 42,2 (CH_2) ; 50,1 (CH_2) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 60,7 ($3\text{C}_{6\text{su}}$) ; 62,1 (CHN) ; 65,4 (3C_8) ; 66,4 ; 69,9 ; 70,4 ; 72,6 ; 72,8 (6C_{su}) ; 99,5 ($3\text{C}_{1\text{su}}$) ; 124,4 (3C_6) ; 143,6 ; 143,9 (3C_5) ; 165,8 ($\text{C}=\text{O}_{\text{biotine}}$) ; 171,7 ; 172,5 ; 172,8 ; 174,5 ; 175,3 ; 176,5 ; 176,8 ($3\text{C}_1, 2\text{C}=\text{O}_{\text{spacer}}$).

Composé glycoconjugué (199)



$\text{C}_{68}\text{H}_{110}\text{N}_{18}\text{O}_{25}\text{S}$

1611,77 g/mol

Une solution de composé **196** (0,100 g – 0,050 mmol) dans 14,2 mL de MeOH anhydre est traitée par une solution de MeONa (0,025 g dans 25 mL). Le milieu est neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée et le filtrat est concentré sous vide puis lyophilisé pour donner le composé **199** (0,081 g – 0,050 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,14 (n-propanol/ H_2O 70:30)

PF : 139 – 142 °C

$[\alpha]_D^{22} = +96,9$ (c 0,355 – H_2O)

IR (pur) ν (cm^{-1}): 3327 (O-H, N-H, ν) ; 3077 ($\text{Csp}_2\text{-H}$, ν) ; 2930 ($\text{Csp}_3\text{-H}$, ν) ; 1633 ($\text{C}=\text{O}$ amide, ν).

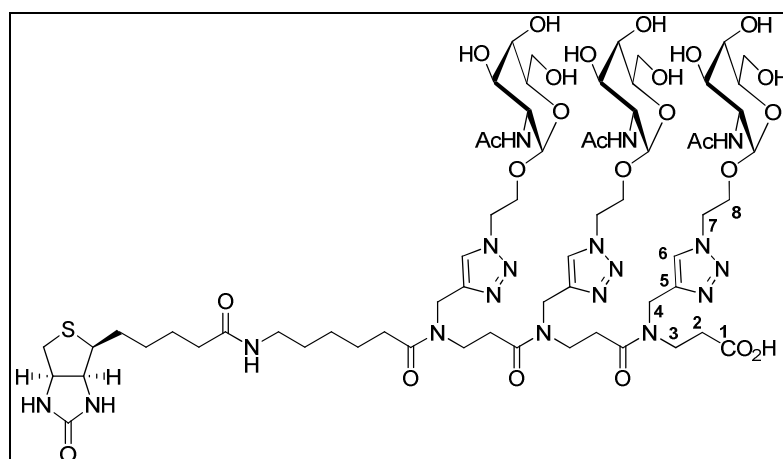
HR-MS : m/z calculé pour $[\text{C}_{68}\text{H}_{110}\text{N}_{18}\text{O}_{25}\text{S}+2\text{H}]^{2+}$ 806,3878 ; trouvé 806,3835 (5,3 ppm)

HPLC : $t_R = 5,9$ min. ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,36 ; 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 1,28 – 1,76 (m, 12H, CH₂) ; 1,99 (s, 9H, 3CH₃ NHAc) ; 2,23 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH₂) ; 2,49 (m, 3H, CH₂) ; 2,59 – 3,02 (m, 7H, CH₂S, CH₂) ; 3,16 (m, 2H, CH₂) ; 3,29 (m, 1H, CHS) ; 3,45 (m, 3H, H_{5su}) ; 3,54 – 3,96 (m, 21H, 6H_{6su}, 6H_{su}, 3H₈, 6H₃) ; 4,09 (m, 6H, 3H_{2su}, 3H₈) ; 4,40 (m, 1H, CHN) ; 4,50 – 4,75 (m, 13H, CHN, 6H₄, 6H₇) ; 4,82 (m, 3H, H_{1su}) ; 8,04 – 8,14 (m, 3H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 22,0 (CH₃ NHAc) ; 24,6 ; 25,3 ; 25,9 (CH₂) ; 27,2 ; 27,2 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 27,2 ; 27,7 ; 28,2 (CH₂) ; 31,3 ; 31,7 ; 32,0 ; 32,5 ; 32,9 ; 33,7 ; 34,2 ; 34,4 (CH₂) ; 35,5 (CH₂) ; 39,0 ; 39,7 (CH₂) ; 40,8 ; 41,0 ; 42,4 ; 42,6 ; 43,1 ; 43,2 ; 43,4 ; 43,6 ; 44,2 ; 44,3 ; 44,5 ; 44,7 (CH₂) ; 49,7 (3C_{2su}) ; 50,2 (3C₄) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 61,0 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 65,6 ; 65,7 ; 66,6 (3C₈) ; 67,6 ; 67,6 (3C_{3su}, 3C_{4su}) ; 71,0 (3C_{5su}) ; 82,6 ; 82,7 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 96,8 ; 96,9 (3C_{1su}) ; 124,0 ; 124,2 (3C₆) ; 165,2 (C=O_{biotine}) ; 172,4 ; 172,7 ; 173,1 ; 173,3 ; 174,2 ; 174,3 ; 176,1 ; 176,3 (3C₁, C=O NHAc, 2C=O_{spacer}).

Composé glycoconjugué (200)



C₆₄H₁₀₂N₁₈O₂₅S

1555,67 g/mol

Une solution de composé **199** (0,020 g – 0,012 mmol) est traitée par un mélange TFA/CH₂Cl₂ 1:1 (0,5 mL) pendant 1h30, selon la *procédure générale* de déprotection d'acide protégé sous forme d'ester *tert*-butylique. Le TFA est évaporé sous vide par co-évaporations répétées avec du CH₂Cl₂. On obtient l'acide **200** (0,019 g – 0,012 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,05 (n-propanol/H₂O 70:30)

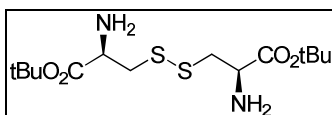
HR-MS : m/z calculé pour [C₆₄H₁₀₂N₁₈O₂₅S+2H]²⁺ 778,3560 ; trouvé 778,3565 (1,01 ppm)

HPLC : t_R = 4,9 min (H₂O/MeOH 30:70)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) : 1,20 – 1,40 (m, 4H, CH₂) ; 1,41 – 1,74 (m, 8H, CH₂) ; 1,96 (s, 9H, 3NHAc) ; 2,21 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₂) ; 2,37 – 2,41 (m, 2H, CH₂) ; 2,56 (m, 1H, J = 7,1 Hz, CH₂) ; 2,60 – 2,96 (m, 7H, CH₂S, CH₂) ; 3,13 (m, 2H, CH₂) ; 3,26 (m, 1H, CHS) ; 3,43 (m, 3H, H_{5su}) ; 3,50 – 3,92 (m, 21H, 6H_{6su}, 6H_{su}, 3H₈, 6H₃) ; 4,06 (m, 6H, 3H_{2su}, 3H₈) ; 4,37 (m, 1H, CHN) ; 4,49 – 4,74 (m, 13H, CHN, 6H₄, 6H₇) ; 4,79 (m, 3H, H_{1su}) ; 7,94 – 8,10 (m, 3H, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) : 22,0 (CH₃ NHAc) ; 24,6 ; 25,2 ; 25,8 (CH₂) ; 27,7 ; 27,9 ; 28,1 (CH₂) ; 30,8 ; 31,3 ; 31,6 ; 32,0 ; 32,3 ; 32,5 ; 32,9 (CH₂) ; 35,5 (CH₂) ; 39,0 ; 39,7 (CH₂) ; 40,9 ; 43,2 ; 43,4 ; 43,6 ; 44,0 ; 44,8 (CH₂) ; 49,7 (3C_{2su}) ; 50,2 (3C₄) ; 55,4 (CHS) ; 60,2 (CHN) ; 61,0 (3C_{6su}) ; 62,1 (CHN) ; 65,6 (3C₈) ; 67,5 ; 68,3 (3C_{3su}, 3C_{4su}) ; 71,0 (3C_{5su}) ; 96,8 (3C_{1su}) ; 124,2 ; 124,8 (3C₆) ; 143,5 (3C₅) ; 162,6 ; 163,0 ; 165,3 (C=O_{biotine}) ; 173,8 ; 174,2 ; 176,5 ; (3C₁, C=O NHAc, 2C=O_{spacer}).

(2R,7R)-cystine di-tert-butylester (201)



C₁₄H₂₈N₂O₄S₂

352,51 g/mol

L'acétate de *tert*-butyle (8,6 g – 10 mL – 74 mmol) est ajouté à une solution de (2R,7R)-cystine (0,4 g – 1,7 mmol) dans 0,722 mL d'acide perchlorique 60% aqueux (1,2 g – 7,5 mmol). Après 60h d'agitation à température ambiante, le pH est ajusté à 7,8 par ajout de solutions aqueuses de soude 2M et de NaHCO₃ 1M. Le milieu est extrait par Et₂O (3x). Les phases organiques réunies sont lavées par de la saumure (3x), séchées sur Na₂SO₄ puis concentrées sous vide. On obtient la (2R,7R)-cystine di-*tert*-butylester **201** (0,569 g – 1,62 mmol) sous forme d'une huile incolore qui est séchée sur P₂O₅ à 1,5 kPa pendant quelques heures.

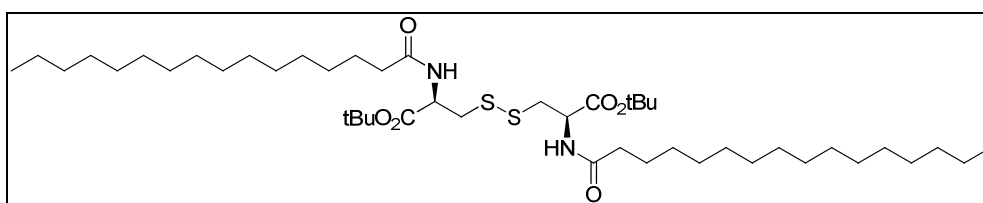
Rendement : 95%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,50 (s, 18H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,71 (s, 4H, NH₂) ; 2,85 (dd, 2H, *J* = 7,0 Hz, *J* = 14,0 Hz, Cys-CH₂) ; 3,12 (dd, 2H, *J* = 4,0 Hz, *J* = 14,0 Hz, Cys-CH₂) ; 3,67 (dd, 1H, *J* = 4,0 Hz, 7,0 Hz, Cys-CH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 28,2 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 44,2 (Cys-CH₂) ; 54,4 (Cys-CH) ; 81,2 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 173,0 (C=O CO₂tBu).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸³

(2*R*,2'*R*)-tert-butyl 3,3'-disulfanediybis(2-palmitamidopropanoate) (202)



C₄₆H₈₈N₂O₆S₂

829,33 g/mol

Le DCC (4,1 g – 20 mmol) et la DMAP (0,24 g – 2 mmol) sont ajoutés à une solution d'acide palmitique (5,1 g – 20 mmol) dans 40 mL de CH₂Cl₂. Après addition de (2*R*,7*R*)-cystine di-tert-butylester **201** (3,0 g – 8,5 mmol), le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante. Après 90 min, le précipité de dicyclohexylurée est filtré. Le filtrat est dilué dans CH₂Cl₂ puis lavé successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique 5% (3x), une solution aqueuse de NaHCO₃ 5% (3x) puis par H₂O (3x). La phase organique lavée est séchée sur Na₂SO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut est recristallisé dans 50 mL de MeOH chaud à 0°C, lavé avec du MeOH froid avant d'être séché sous vide pour donner le (Pal-Cys-OtBu)₂ **202** (5,2 g – 6,29 mmol) sous forme d'un solide blanc.

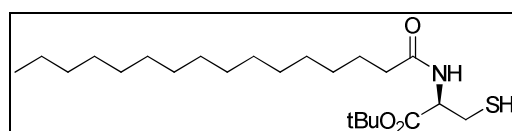
Rendement : 74%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0,87 (t, 6H, *J* = 6,7 Hz, CH₃ Pal) ; 1,17 – 1,36 (m, 48H CH₂ Pal) ; 1,46 (s, 18H, C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,62 (m, 4H, CH₂ Pal) ; 2,23 (m, 4H, CH₂ Pal) ; 3,16 (dd, 2H, *J* = 5,3 Hz, *J* = 14,5 Hz, Cys-CH₂) ; 3,21 (dd, 2H, *J* = 5,3 Hz, *J* = 14,2 Hz, Cys-CH₂) ; 4,74 (m, 2H, CH) ; 6,45 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, 2NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14,1 (CH_3 Pal) ; 22,6 ; 25,5 (CH_2 Pal) ; 27,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 29,3 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 31,9 ; 36,5 ; 41,6 (CH_2 Pal, Cys- CH_2) ; 52,4 (CH) ; 82,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 169,5 ($\text{C}=\text{O} \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 173,0 ($\text{C}=\text{O}$ amide Pal).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸⁴

(R)-tert-butyl 3-mercapto-2-palmitamidopropanoate (203)



$\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_3\text{S}$

415,67 g/mol

Sous atmosphère inerte, le (Pal-Cys- OtBu)₂ **202** (3,8 g – 4,58 mmol) en solution dans 60 mL de CHCl_3 est réduit en présence de dithioérythritol (3,0 g – 19,45 mmol) et de triéthylamine (2,0 mL – 14,35 mmol). Après agitation à température ambiante pendant 2h, le milieu est lavé par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (3 x 50 mL) puis par H_2O (saturées en N_2). La phase organique résultante est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le résidu est solubilisé dans 30 mL de MeOH et cristallisé à -20°C . Après un lavage au MeOH froid et séchage sous vide, on obtient le Pal-Cys- OtBu **203** (1,90 g – 4,58 mmol) sous forme d'un solide incolore.

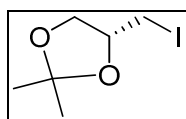
Rendement : quantitatif.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0,86 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3 Pal) ; 1,18 – 1,35 (m, 25H, CH_2 Pal) ; 1,47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 1,63 (m, 1H, CH_2 Pal) ; 2, 23 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, CH_2 Pal) ; 2,95 (ddd, 1H, $J = 3,7$ Hz, $J = 9,0$ Hz, $J = 14,0$ Hz, Cys- CH_2) ; 3,01 (ddd, 1H, $J = 4,2$ Hz, $J = 8,8$ Hz, $J = 14,0$ Hz, Cys- CH_2) ; 4,74 (m, 1H, CH) ; 6,36 (d, 1H, $J_{\text{NH-CH}} = 6,7$ Hz, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14,1 (CH_3 Pal) ; 22,6 ; 25,6 (CH_2 Pal) ; 27,0 (CH_2) ; 28,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 31,9 ; 36,6 (CH_2 Pal, Cys- CH_2) ; 53,6 (CH) ; 82,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3 \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 169,2 ($\text{C}=\text{O} \text{CO}_2t\text{Bu}$) ; 172,8 ($\text{C}=\text{O}$ amide Pal).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸³

(R)-4-(iodométhyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane (204)



242,05 g/mol

Sous atmosphère inerte, du diiode (2,88 g – 11,35 mmol) est ajouté en trois portions à 0°C en 30 min à une suspension d'imidazole (1,03 g – 15,13 mmol) et de la triphénylphosphine (2,98 g – 11,35 mmol) dans 22,8 mL d'un mélange Et₂O/CH₂Cl₂ (2:1). Le milieu est maintenu sous agitation pendant 10 min puis une solution de (*S*)-solketal (1,0 g – 7,57 mmol) dans 12,4 mL d'Et₂O/CH₂Cl₂ (2:1) est ajoutée. L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 22h puis les solides sont filtrés et lavés par Et₂O. Le filtrat est concentré sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/Pentane de 20:80 à 40:60) pour donner le composé iodé **204** (1,41 g – 5,82 mmol) sous forme d'une huile incolore volatil (*lit.* $\theta_{\text{éb}} = 50^\circ\text{C}$ sous 7mmHg).

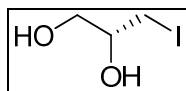
Rendement : 77%

CCM : R_f = 0,57 (AcOEt/Cyclohexane 40:60)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,33 (s, 3H, C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 1,44 (s, 3H, C(CH₃)₂ isopropylidène) ; 3,13 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 9,7$ Hz, 1CH₂I) ; 3,24 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, $J = 9,7$ Hz, 1CH₂I) ; 3,77 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, $J = 8,5$ Hz, 1CH₂O) ; 4,13 (dd, 1H, $J = 6,1$ Hz, $J = 8,5$ Hz, 1CH₂O) ; 4,26 (m, 1H, CH).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸⁵

(R)-3-iodopropane-1,2-diol (205)



Une solution de composé **204** (0,200 g – 0,826 mmol) dans 1 mL d'acétone est chauffée à 80°C pendant 30 min en présence de 2,5 mL d'HCl 1N. Le milieu est concentré sous vide puis extrait avec AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide pour donner le composé **205** (0,148 g – 0,735 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 89%

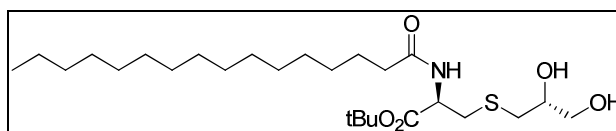
CCM : R_f = 0,24 (AcOEt/Cyclohexane 60:40)

PF : 44 – 47°C (*lit.* 46 – 48°C)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2,26 (se, 2H, OH) ; 3,26 (dd, 1H, *J* = 6,3 Hz, *J* = 10,3 Hz, 1 CH₂I) ; 3,32 (dd, 1H, *J* = 4,8 Hz, *J* = 10,3 Hz, 1CH₂I) ; 3,66 (dd, 1H, *J* = 7,0 Hz, *J* = 12,1 Hz, 1CH₂OH) ; 3,77 (m, 2H, 1CH₂OH, CHOH).

*Les données spectroscopiques et physico-chimique sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸⁵

(R)-tert-butyl 3-((R)-2,3-dihydroxypropylthio)-2-palmitamidopropanoate (206)



Le (R)-3-iodopropane-1,2-diol **205** (0,39 g – 1,9 mmol) et la triéthylamine (1,0 mL – 0,74 mmol) sont ajoutés à une solution de Pal-Cys-*Or*Bu **203** (0,16 g – 0,38 mmol) dans 0,61 mL de DMF. Après agitation pendant 10 min à 70°C puis 5h à température ambiante, le DMF est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans 50 mL de CHCl₃ puis lavé successivement

par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (3 x 25 mL) puis par H₂O (saturées en N₂). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. On obtient le composé **206** (0,124 g – 0,255 mmol).

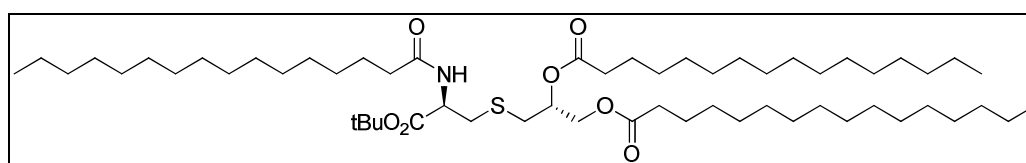
Rendement : 67%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0,84 (t, 3H, CH₃ Pal) ; 1,13 – 1,35 (m, 26H, CH₂ Pal) ; 1,44 (s, 9H, (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 1,59 (m, 1H, CH₂ Pal) ; 2,20 (m, 1H, CH₂ Pal) ; 2,60 (dd, 1H, *J*_{CH₂-CH} = 7,8 Hz, *J* = 13,7 Hz, *S*-glyceryl-CH₂) ; 2,72 (dd, 1H, *J* = 4,6 Hz, *J* = 13,7 Hz, *S*-glyceryl-CH₂) ; 2,88 (m, 1H, Cys-CH₂) ; 2,98 (dd, 1H, *J* = 4,9 Hz, *J* = 13,9 Hz, Cys-CH₂) ; 3,50 (dd, 1H, *J* = 6,1 Hz, *J* = 11,3 Hz, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 3,64 (dd, 1H, *J* = 3,6 Hz, *J* = 11,3 Hz, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 3,74 (m, 1H, Cys-CH) ; 4,67 (m, 1H, *S*-glyceryl-CH) ; 6,64 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 14,0 (CH₃ Pal) ; 22,5 ; 25,5 (CH₂ Pal) ; 27,8 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 29,1 ; 29,2 ; 29,4 ; 29,6 ; 31,8 ; 35,3 ; 36,4 (CH₂ Pal, Cys-CH₂, *S*-glyceryl-CH₂) ; 52,6 (Cys-CH) ; 65,1 (*S*-glyceryl-OCH₂) ; 71,0 (*S*-glyceryl-OCH) ; 82, 8 (C(CH₃)₃ CO₂tBu) ; 169,9 (C=O CO₂tBu) ; 173,4 (C=O amide Pal).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸⁴

(*R*)-3-((*R*)-3-tert-butoxy-3-oxo-2-palmitamidopropylthio)propane-1,2-diyl-dipalmitate (207)



C₅₈H₁₁₁NO₇S

966,57 g/mol

L'acide palmitique (1,1 g – 4,2 mmol), la DMAP (0,05 g – 0,43 mmol) et le DCC (0,9 g – 4,3 mmol) sont ajoutés à une solution de composé **206** (0,88 g – 1,8 mmol) dans 17 mL de CHCl₃. Après 2h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué dans 30 mL de CHCl₃ et le précipité de dicyclohexylurée est filtré. Le filtrat est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (3 x 50 mL), H₂O (3 x 50 mL), une solution aqueuse de NaHCO₃ 5% (3 x 50 mL) puis par H₂O (3 x 50 mL). La phase organique est

séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le résidu cristallise dans un mélange MeOH/CHCl₃ (5:1) pour donner le composé **207** (0,748 g – 0,77 mmol) sous forme d'un solide incolore.

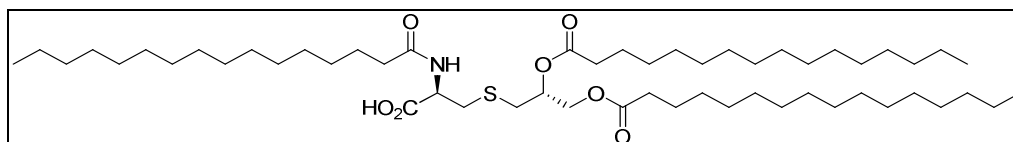
Rendement : 43%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0,82 – 0,91 (m, 9H, CH₃ Pal) ; 1,16 – 1,37 (m, 72H, CH₂ Pal) ; 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 1,53 – 1,70 (m, 6H, CH₂ Pal) ; 2,22 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz, CH₂ Pal) ; 2,30 (m, 4H, CH₂ Pal) ; 2,73 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz, *S*-glyceryl-CH₂) ; 2,98 (dd, 1H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 13,8 Hz, Cys-CH₂) ; 3,07 (dd, 1H, *J* = 4,6 Hz, *J* = 13,8 Hz, Cys-CH₂) ; 4,13 (dd, 1H, *J* = 6,1 Hz, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 4,32 (dd, 1H, *J* = 3,3 Hz, *J* = 11,8 Hz, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 4,70 (m, 1H, Cys-CH) ; 5,08 – 5,18 (m, 1H, *S*-glyceryl-CH) ; 6,32 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 14,1 (CH₃ Pal) ; 22,7 ; 24,9 ; 25,6 (CH₂ Pal) ; 28,0 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 29,2 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,7 ; 31,9 ; 33,2 ; 34,1 ; 34,3 ; 35,2 ; 36,5 (CH₂ Pal, Cys-CH₂, *S*-glyceryl-CH₂) ; 52,5 (Cys-CH) ; 63,5 (*S*-glyceryl-OCH₂) ; 70,3 (*S*-glyceryl-OCH) ; 82,9 (C(CH₃)₃ CO₂*t*Bu) ; 170,0 – 172,9 (C=O Pal, CO₂*t*Bu) ; 173,3 (C=O amide)

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*¹⁸⁴

Acide (*R*)-3-((*R*)-2,3-bis(palmitoyloxy)propylthio)-2-palmitamidopropanoïque (**208**)



C₅₄H₁₀₃NO₇S

910,46 g/mol

Le composé **207** (0,051 g – 0,05 mmol) est traité par du TFA (0,500 mL – 7,0 mmol) pendant 1h à température ambiante avant d'être concentré sous vide à 50°C. Le résidu est repris dans H₂O et le précipité incolore obtenu est lavé par de l'eau froide, avant d'être filtré et séché sous vide pour donner l'acide **208** (0,027 g – 0,03 mmol) sous forme d'un solide blanc.

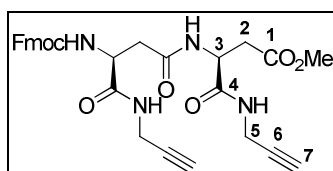
Rendement : 61%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0,87 (t, 9H, CH₃ Pal) ; 1,25 (m, 72H, CH₂ Pal) ; 1,61 (m, 6H, CH₂ Pal) ; 2,31 (m, 6H, CH₂ Pal) ; 2,74 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 3,03 (dd, 1H, *J* = 6,1 Hz, *J* = 13,9 Hz, Cys-CH₂) ; 3,15 (dd, 1H, *J* = 4,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, Cys-CH₂) ; 4,12 (m, 1H, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 4,34 (dd, 1H, *J* = 3,2 Hz, *J* = 11,9 Hz, *S*-glyceryl-OCH₂) ; 4,76 (m, 1H, Cys-CH) ; 5,15 (m, 1H, *S*-glyceryl-CH) ; 6,67 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 14,1 (CH₃ Pal) ; 22,7 ; 24,8 ; 24,9 ; 25,5 ; 29,1 ; 29,3 ; 29,5 ; 29,7 ; 31,9 ; 32,9 ; 34,1 ; 34,3 ; 36,3 (CH₂ Pal, Cys-CH₂, *S*-glyceryl-CH₂) ; 52,1 (Cys-CH) ; 63,6 (*S*-glyceryl-OCH₂) ; 70,2 (*S*-glyceryl-CH) ; 173,6 ; 173,7 (C=O).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles de la littérature.*¹⁸⁴

Dimère (209)



C₃₀H₃₀N₄O₇

558,58 g/mol

Une solution d'acide **72** (0,091 g – 0,166 mmol) dans 2,6 mL d'un mélange DMF/MeOH (1:1) est traitée par de la DMAP (0,002 g – 0,017 mmol) puis par EDCi.HCl (0,038 g – 0,200 mmol) pendant 12h. Les solvants sont évaporés sous vide. Le produit brut solide est lavé sur verre fritté n°4, successivement par une solution d'acide citrique 5% (3x), par de l'eau (3x), par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (3x), de nouveau par de l'eau (3x). Le produit brut obtenu est séché sous vide pour donner le composé **209** (0,085 g – 0,153 mmol) sous la forme d'un solide blanc.

Rendement : 92%

CCM : R_f = 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 162 – 165 °C

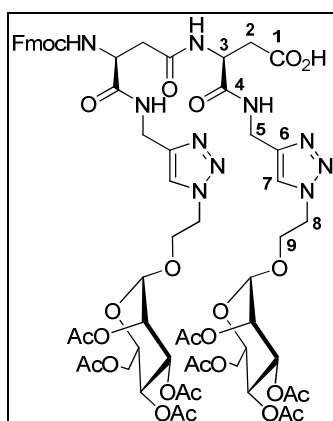
IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3287 (N-H, ν) ; 3080 (Csp₂-H, ν) ; 2951 (Csp₃-H, ν) ; 1722 (C=O ester, ν) ; 1695 (C=O carbamate, ν) ; 1641 (C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₃₀H₃₀N₄O₇+H]⁺ 559,2193 ; trouvé 559,2197 (0,8 ppm).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) (δ (ppm) : 2,50 (m, 4H, 4H₂) ; 3,09 (m, 2H, 2H₇) ; 3,56 (s, 3H, CH₃ CO₂Me) ; 3,86 (m, 4H, 4H₅) ; 4,04 ; 4,70 (m, 5H, 2H₃, CH₂ Fmoc, CH Fmoc) ; 7,34 (m, 2H, 2H_{Ar} Fmoc) ; 7,42 (t, 2H, J = 7,4 Hz, 2H_{Ar} Fmoc) ; 7,72 (d, 1H, J = 7,4 Hz, 1H_{Ar} Fmoc) ; 7,84 (d, 1H, J = 7,4 Hz, 1H_{Ar} Fmoc) ; 7,89 (d, 2H, J = 7,4 Hz, 2H_{Ar} Fmoc) ; 7,57 (d, 1H, J_{NH-H3} = 8,4 Hz, NH_A) ; 8,24 – 8,45 (m, 3H, NH_B, 2NH’).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 27,9 ; 28,0 (2C₅) ; 36,0 ; 37,7 (2C₂) ; 46,5 (CH Fmoc) ; 49,1 (C₃) ; 51,4 ; 51,6 (C₃, CH₃ CO₂Me) ; 65,7 (CH₂ Fmoc) ; 72,8 (2C₇) ; 120,0 ; 121,3 ; 125,2 ; 127,0 ; 127,2 ; 127,6 ; 128,8 (CH_{Ar} Fmoc) ; 140,6 ; 143,7 (C_{Ar} Fmoc) ; 155,7 (C=O Fmoc) ; 169,3 ; 169,9 ; 170,4 ; 170,9 (2C₁, 2C₄).

Dimère « propargylamide » acide glycoconjugué (**210**)



C₆₁H₇₄N₁₀O₂₇

1379,29 g/mol

Le composé **210** est obtenu en appliquant la procédure générale de déprotection d'acide protégé sous forme de CO₂tBu en utilisant :

- Ester **142** (0,040 g – 0,028 mmol)
- TFA/CH₂Cl₂ (2 mL)

Après 2h de réaction et évaporation des solvants, on obtient le composé l'acide **210** (0,038g – 0,028 mmol) sous forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

CCM : R_f = 0,19 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10)

PF : 108 – 111 °C

$[\alpha]_D^{22} = + 20,0$ (c 0,380 – CHCl₃)

IR (pur) ν (cm⁻¹) : 3347 ; 3320 ; 3298 (N-H, ν) ; 2960 ; 2945 (Csp³-H, ν) ; 1745 (C=O ester, ν) ; 1662 (C=O carbamate, C=O amide, ν).

HR-MS : m/z calculé pour [C₆₁H₇₄N₁₀O₂₇+2H]²⁺ 690,2435 ; trouvé 690,2438 (-0,4 ppm).

HPLC : t_R = 5,51 min (H₂O/MeOH 10:90)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,96 ; 1,98 ; 2,02 ; 2,03 ; 2,07 ; 2,08 ; 2,10 (s, 24H, CH₃ OAc) ; 2,77 (m, 3H, 3H₂) ; 2,99 (m, 1H, 1H₂) ; 3,67 (m, 2H, 2H_{5su}) ; 3,84 (m, 2H, 2H₉) ; 4,12 (m, 7H, 2H₉, 4H_{6su}, CH Fmoc), 4,60 (m, 14H, 2H₃, 4H₅, 4H₈, 2H_{1su}, CH₂ Fmoc) ; 5,20 (m, 6H, 2H_{2su}, 2H_{3su}, 2H_{4su}) ; 6,53 (se, 1H, NH_A) ; 7,36 (t, 2H, J = 6,9 Hz, 2H_{Ar} Fmoc) ; 7,54 (m, 2H, 2H₇) ; 7,73 (d, 3H, J = 7,3 Hz, 2H_{Ar}, NH_B) ; 7,91 (m, 6H, 2NH', 4H_{Ar}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 20,6 ; 20,8 (CH₃ OAc) ; 34,4 ; 35,7 (2C₂, 2C₅) ; 46,9 (CH Fmoc) ; 49,4 (2C₈) ; 52,0 ; 52,1 (2C₃) ; 62,3 (2C_{6su}) ; 65,6 ; 65,7 (2C_{su}) ; 65,8 (2C₄) ; 67,4 (2C₉, CH₂ Fmoc) ; 69,0 ; 69,1 ; 69,2 (6C_{su}) ; 97,4 (2C_{1su}) ; 120,0 ; 125,0 ; 127,1 ; 127,8 (CH_{Ar} Fmoc, 2C₇) ; 141,2 ; 143,6 (C_{Ar} Fmoc, 2C₆) ; 156,4 (C=O Fmoc) ; 169,8 ; 170,3 ; 170,5 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 (2C₁, 2C₄, C=O OAc).

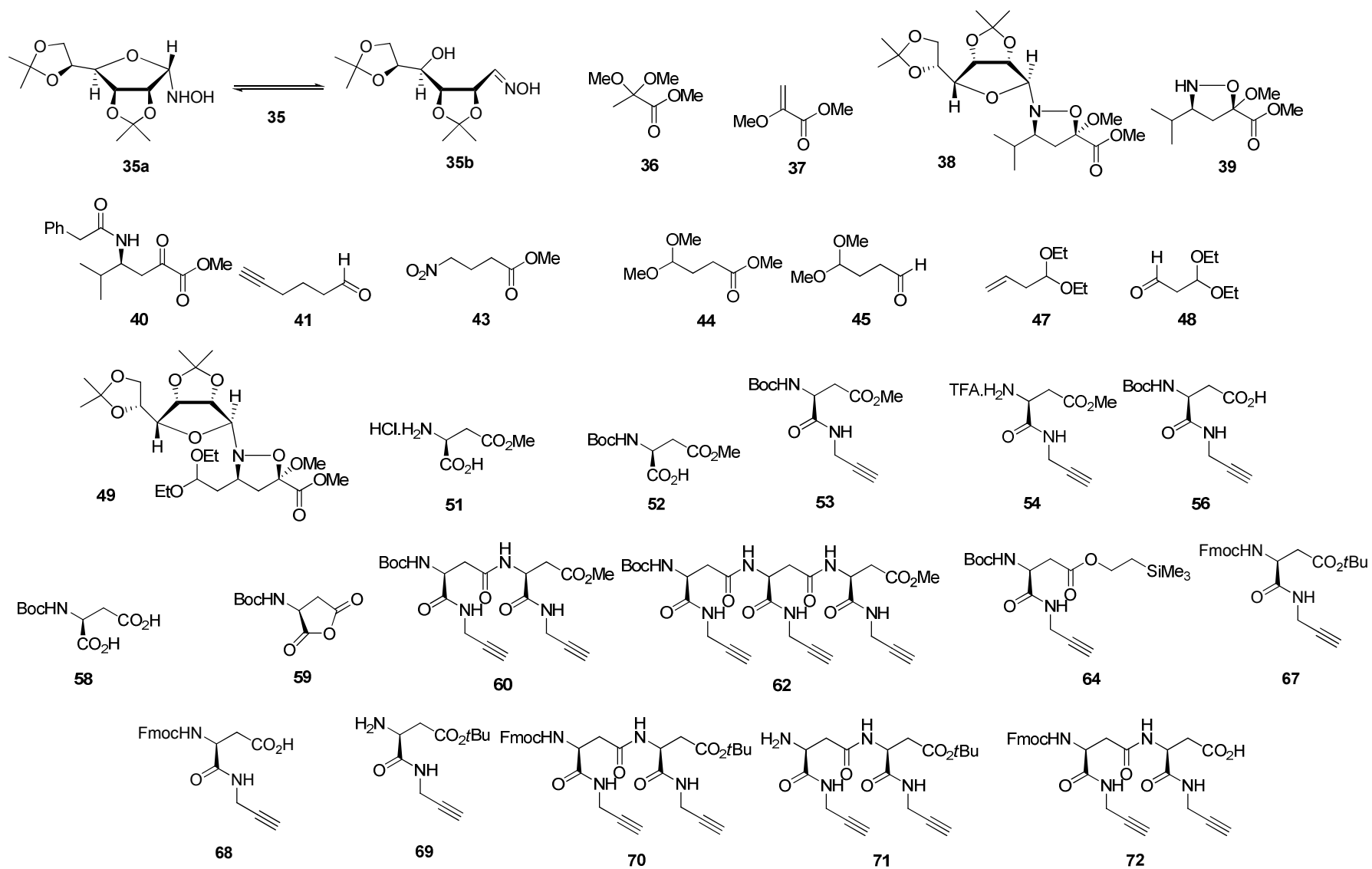
Essai	Masse de dimère 70	Solvant de solubilisation nature / volume	Solvant de gélification nature / volume	Concentration finale	Agitation Vortex (V) Ultrasons (US)	Chauffage	Observations
1	4,9 mg	DMF / 20 µL	CH ₂ Cl ₂ / 0,5 mL	15,7 mM	barreau aimanté + US	/	Formation d'un gel instable Reprécipitation (pilulier)
2	4,7 mg	DMF / 20 µL	CH ₂ Cl ₂ / 0,2 mL	35,5 mM	barreau aimanté + US	/	Formation d'un gel instable Reprécipitation (pilulier)
3	4,9 mg	DMF / 20 µL	CH ₂ Cl ₂ / 0,2 mL	37,1 mM	barreau aimanté + US	/	Formation d'un gel instable Reprécipitation (tube à hémolyse diamètre = 0,5mm)
4	5,5 mg	DMF / 20 µL	CHCl ₃ / 0,2 mL	41,7 mM	vortex V +US	chauffage = solubilisation	Formation d'un gel - Ajout 0,2 mL (CHCl ₃) +V+US : = morceaux de gel en suspension - Ajout 20µL DMF + chauffage+V+US = solubilisation complète
5	4,7 mg	DMF / 20 µL	Toluène/ 0,2 mL	35,5 mM	V+US	/	0,2mL toluène +V+US = formation d'un gel Test du tube retourné = succès - Ajout 0,2mL toluène+V+US = gel moins épais Concentration finale = 12,6mM
6	4,4 mg	DMF / 20 µL	Toluène/ 0,4 mL	18,6 mM	V+US	/	Gélification dès ajout du toluène (prise en masse immédiate sans V ni US) Test du tube retourné = succès
7	5,2 mg	DMF / 20 µL	Toluène/ 0,4 mL ajouté en 1 seule fois	19,1	/	/	Gélification dès ajout du toluène (prise en masse immédiate sans V ni US)
8	5,2 mg	DMF / 10 µL	Toluène/ 0,5 mL	15,3 mM	V+US	/	prise en masse incomplète excédent de liquide
9	4,7 mg	DMF / 20 µL	Cyclohexane / 0,4 mL				DMF/Cyclohexane non miscibles!! Solubilisation incomplète (chauffage)
10	5,0 mg	/	Toluène / 0,4 mL	20,8 mM	V	oui	Refroidissement = gélification assez rapide avec excédent de liquide Test du tube retourné = succès
11	5,2 mg	/	Toluène / 1 mL	20,8 mM	V	oui	Test dans un tube à essais de diamètre 1cm idem que essai 11 → US = épaissement V puis US
12	5,0 mg	DMF 20 µL ajoutés après le toluène	Toluène / 0,4 mL	20 mM	V+US	/	prise en masse progressive test du tube retourné = succès

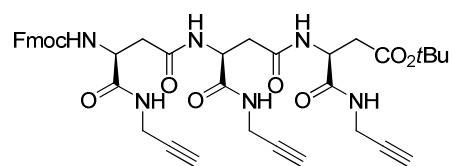
Tableau 16 – Récapitulatif des conditions testées pour l'obtention d'un organogel au départ du dimère 70

Essai	Masse de dimère 72 (mg)	Volume d'eau (mL)	Quantité de NaOH aq. 0,5 M introduite (µL)	Quantité de HCl aq. 0,1 M introduite (µL)	Concentration massique (% w/w)	pH final	Observations
1	4,8	2	100	500	0,18	2	Formation d'un gel fluide
2	5,8	2	200	1200	0,17	2-3	Formation d'un gel fluide
3	4,8	1	100	500	0,30	2	Formation d'un gel fluide plus épais
4	3,8	0,5	50	100	0,58	2	Epaissement avec addition de NaOH Gélification progressive avec addition de HCl aq. Test du tube retourné = succès
5	3,5	0,25	50	125 → 150 → 200	0,70	2	Formation d'un gel Reprécipitation avec l'ajout de HCl aq.
6	3,8	0,2	25	60	1,3	6	Agitation avec vortex Formation d'un gel Test du tube retourné : succès

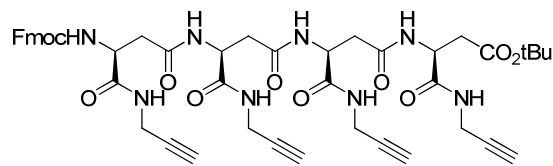
Tableau 17 – Conditions testées pour l'obtention d'un hydrogel au départ du dimère 72

Liste des composés synthétisés

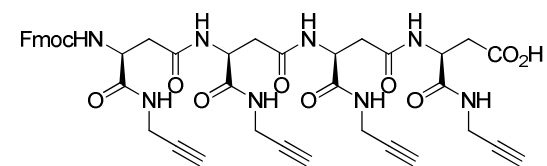




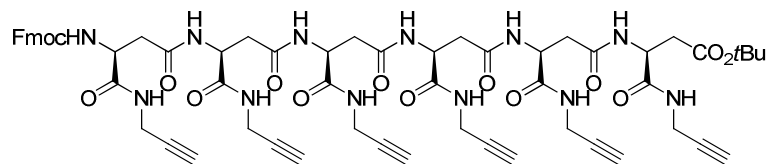
73



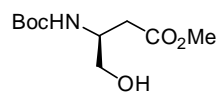
74



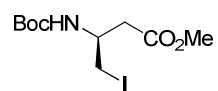
75



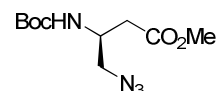
76



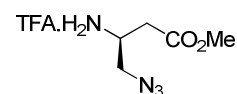
77



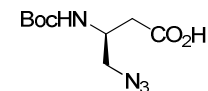
78



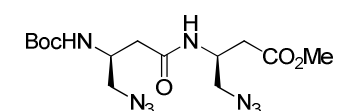
79



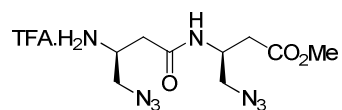
80



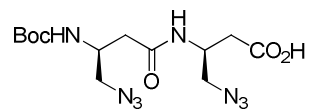
81



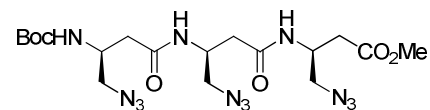
82



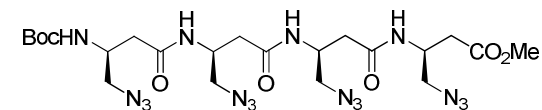
83



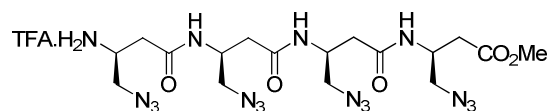
84



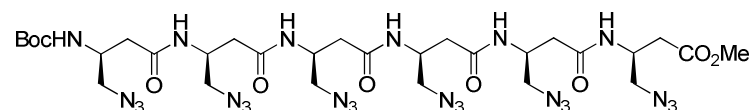
85



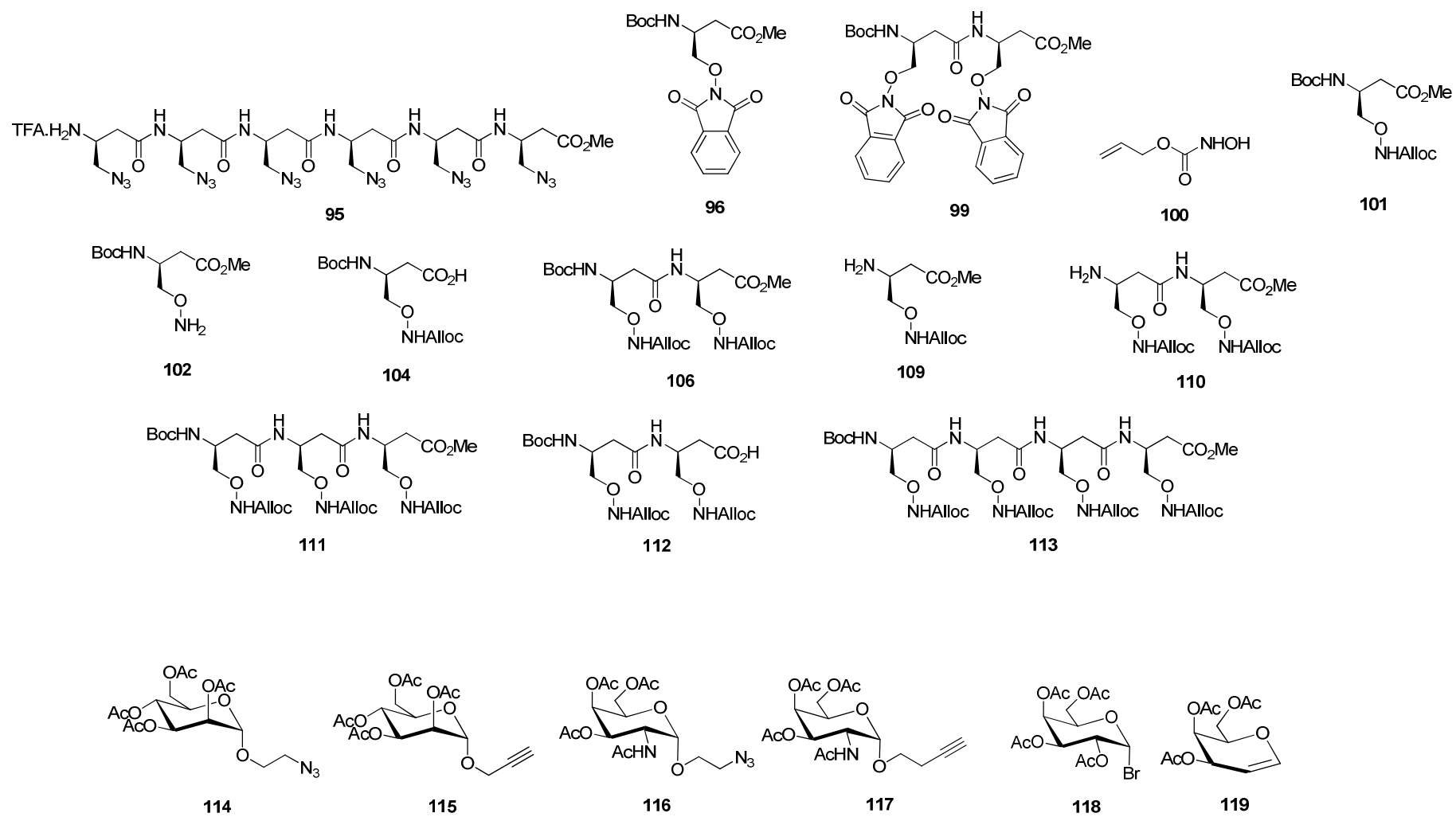
86

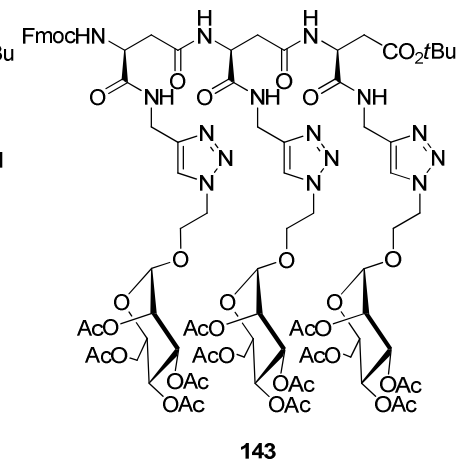
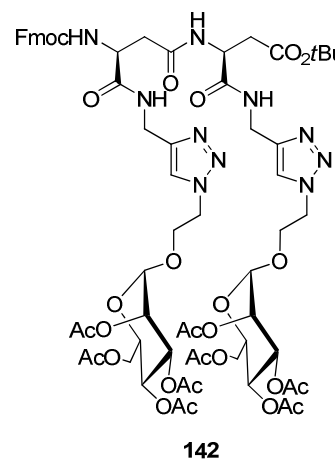
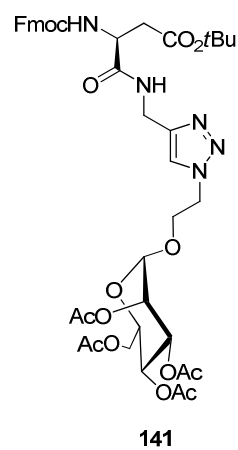
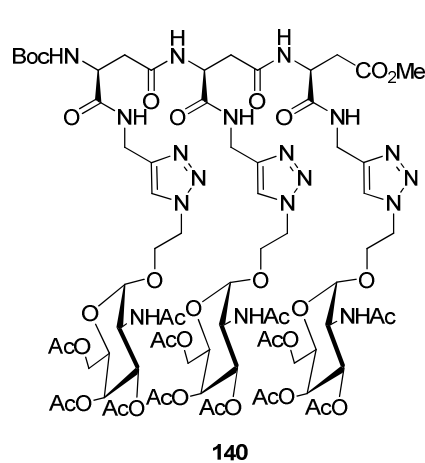
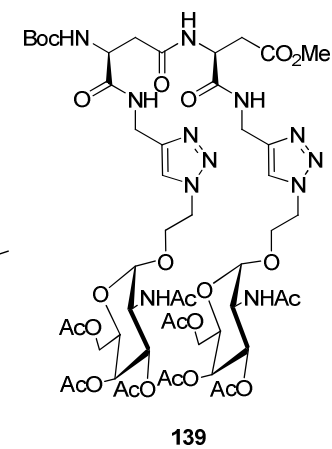
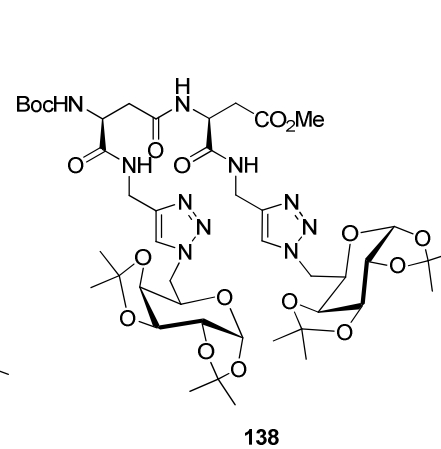
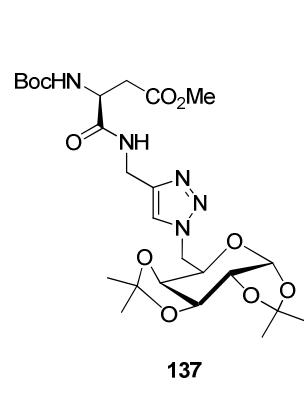
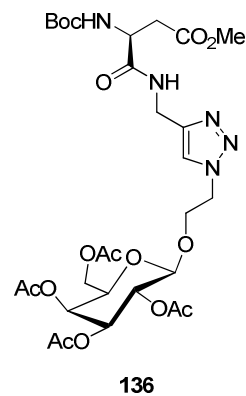
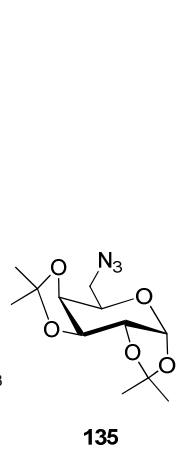
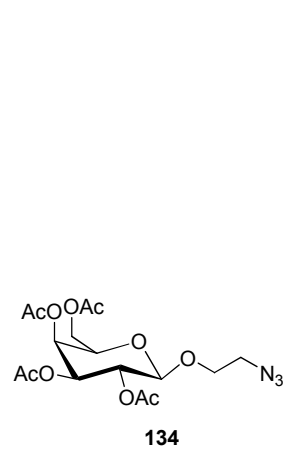
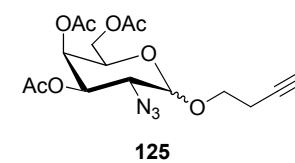
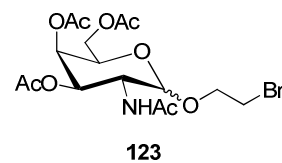
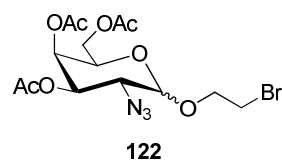
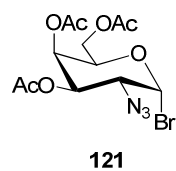
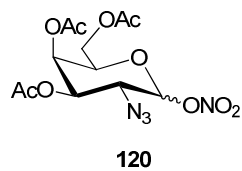


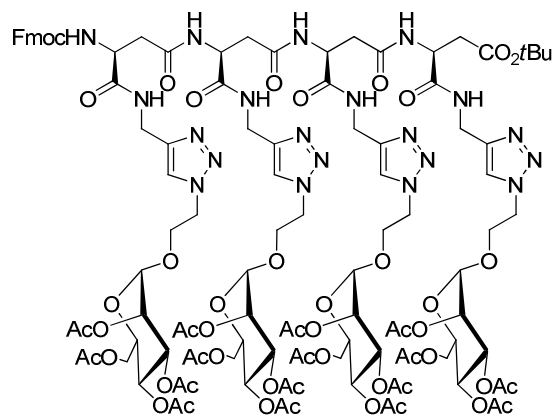
87



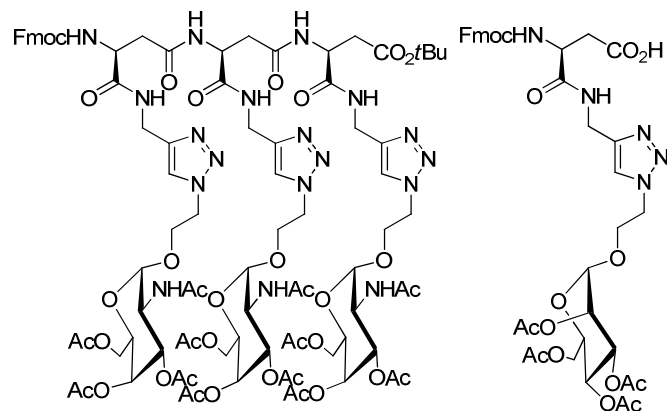
88



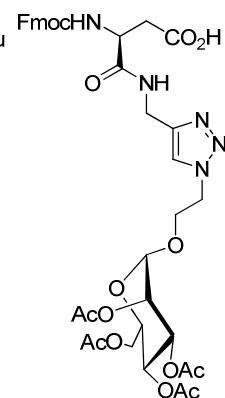




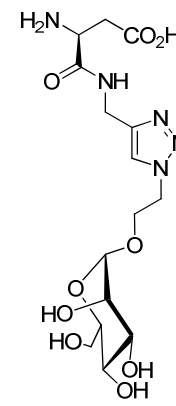
144



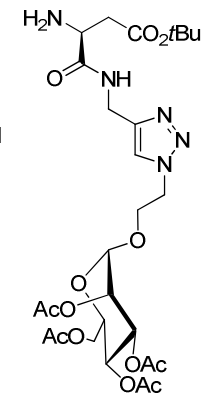
146



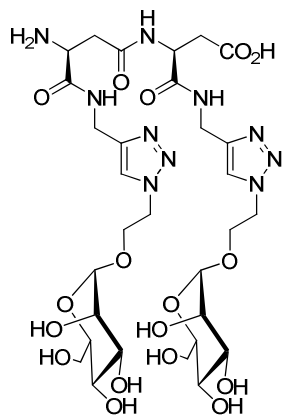
148



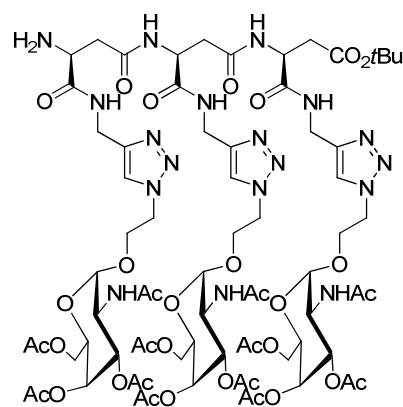
150



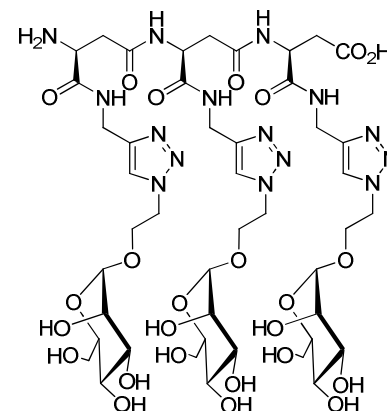
151



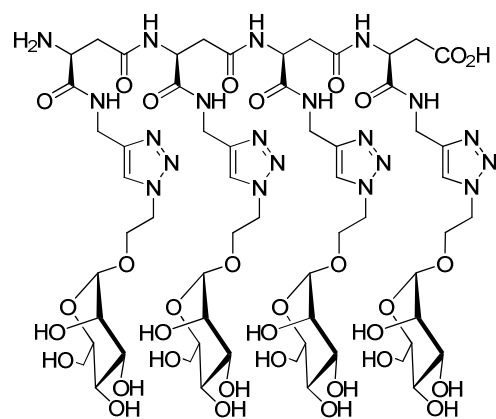
155



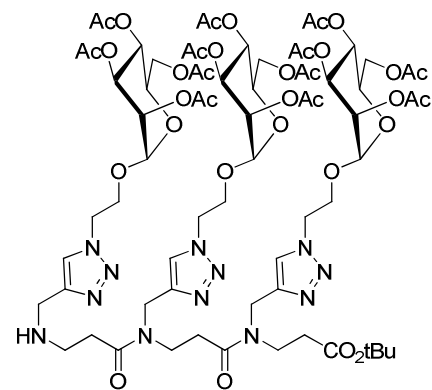
156



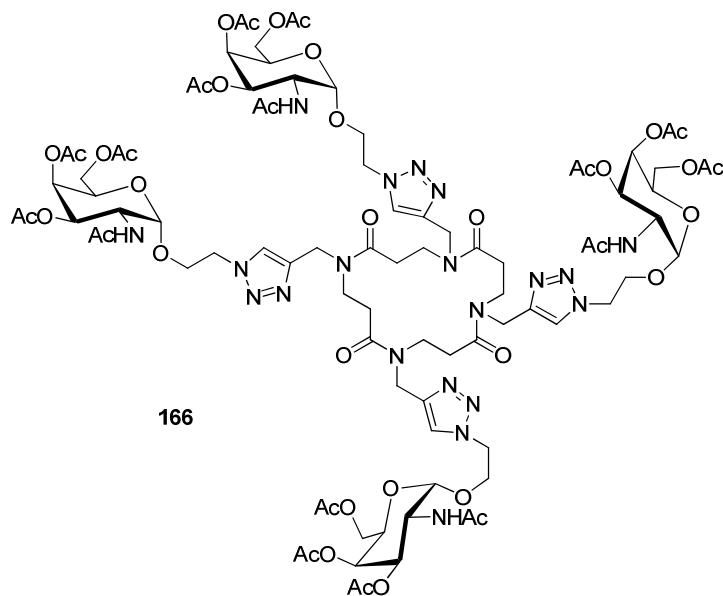
157



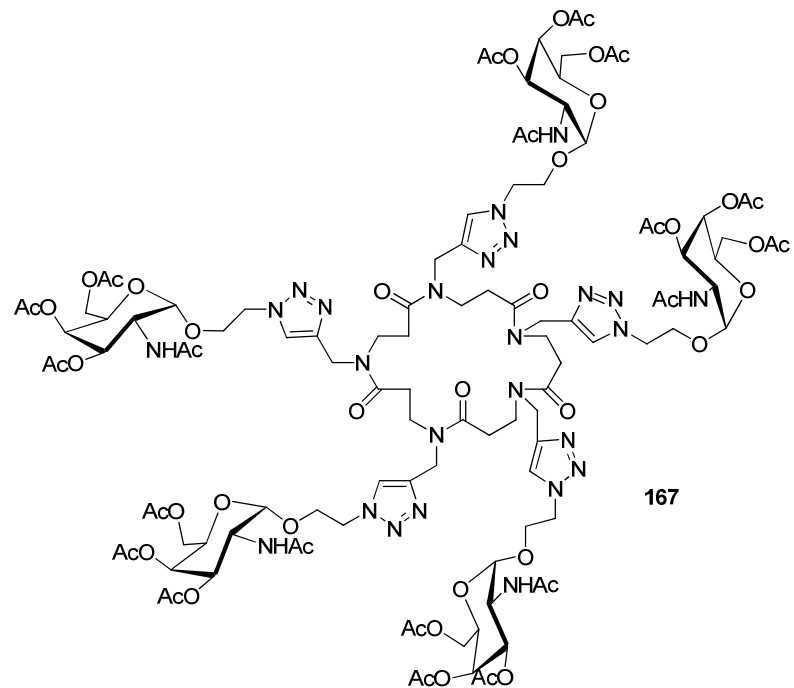
159



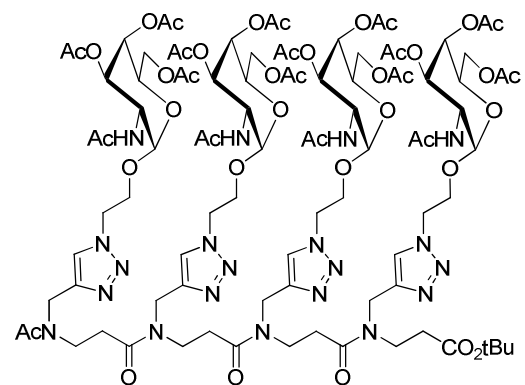
161



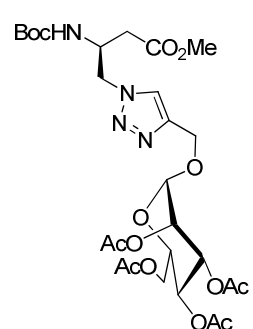
166



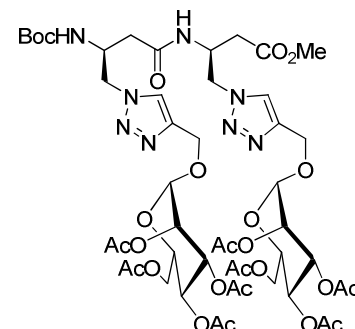
167



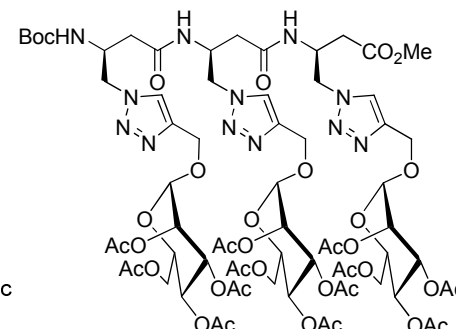
163



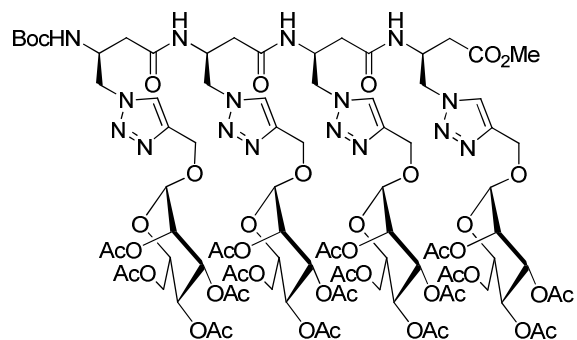
168



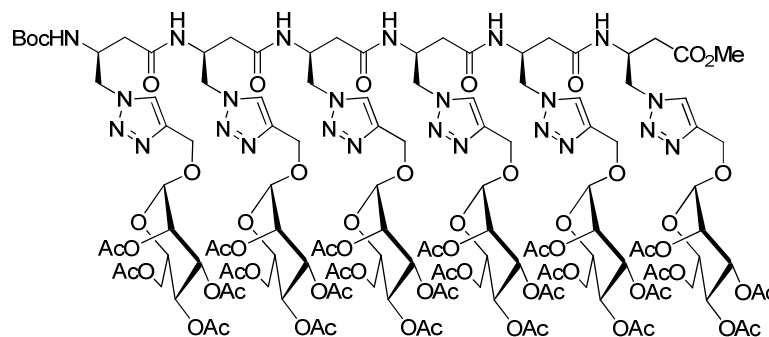
169



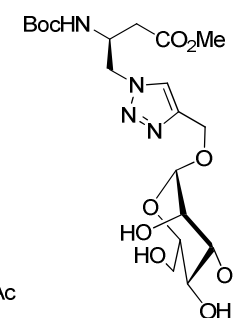
170



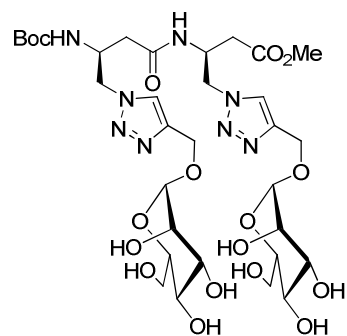
171



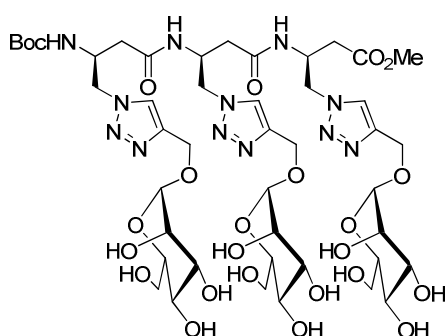
172



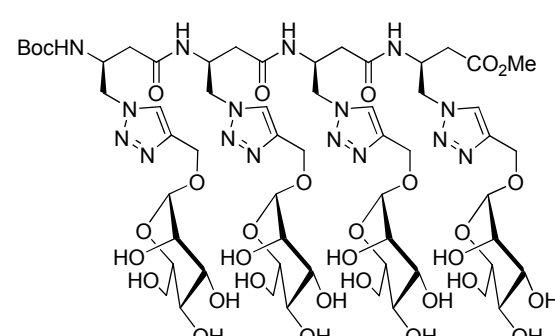
173



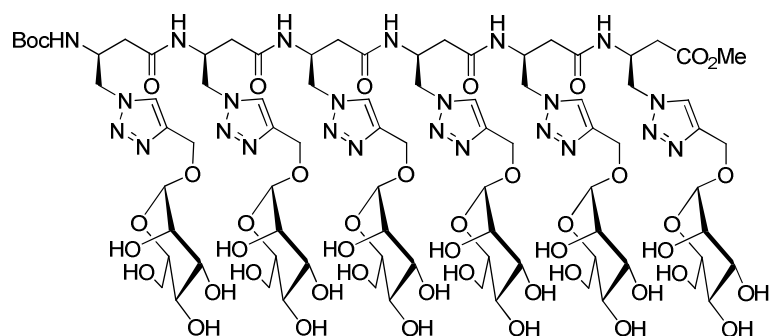
174



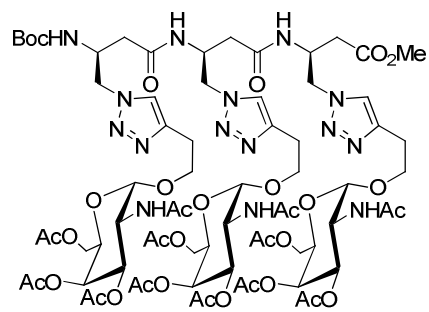
175



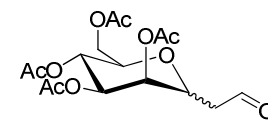
176



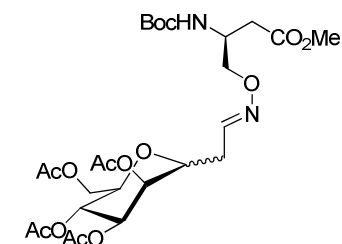
177



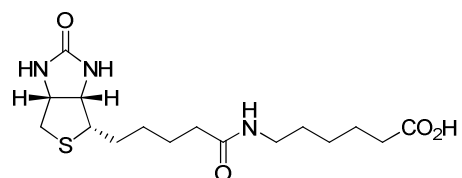
178



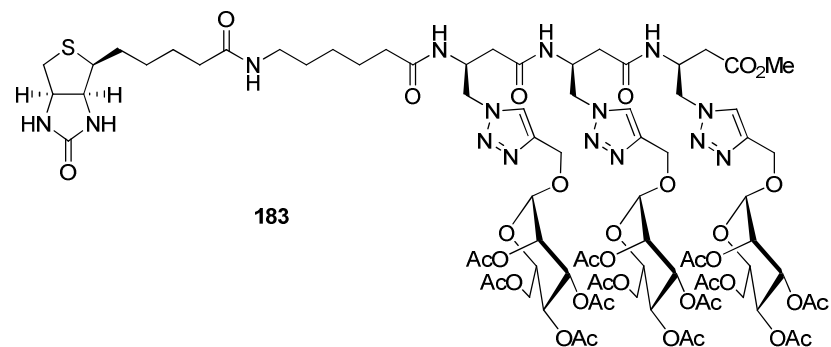
180



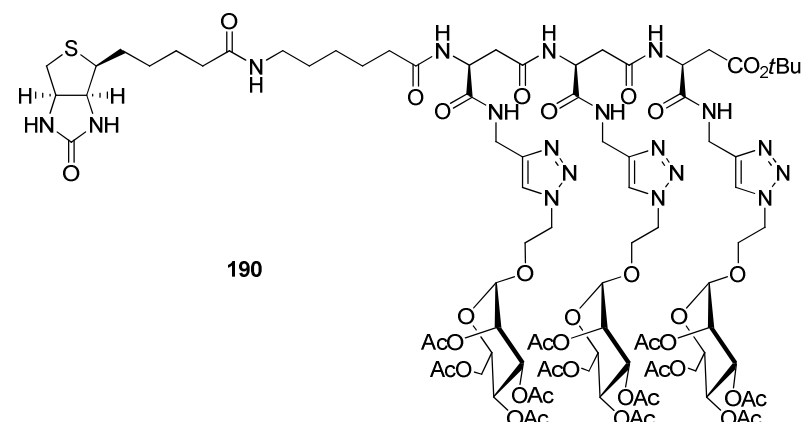
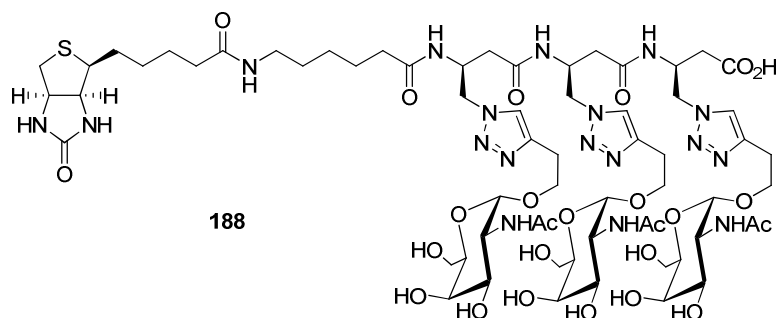
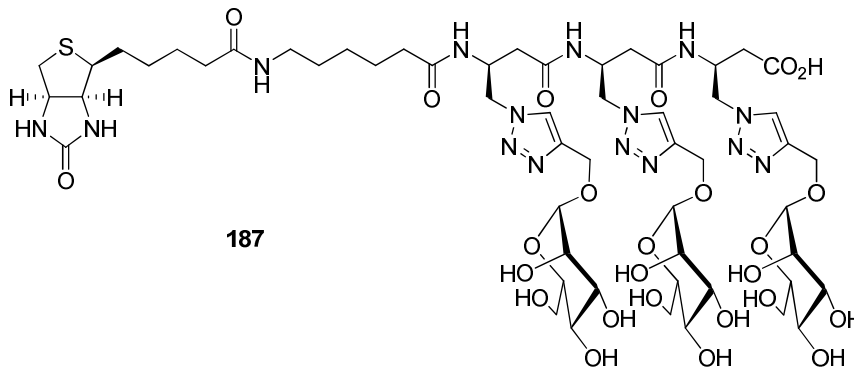
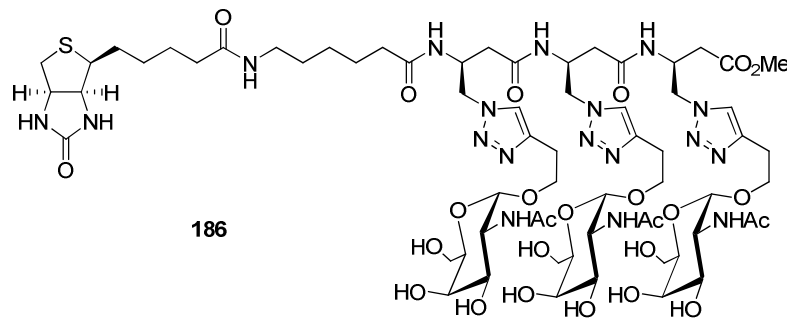
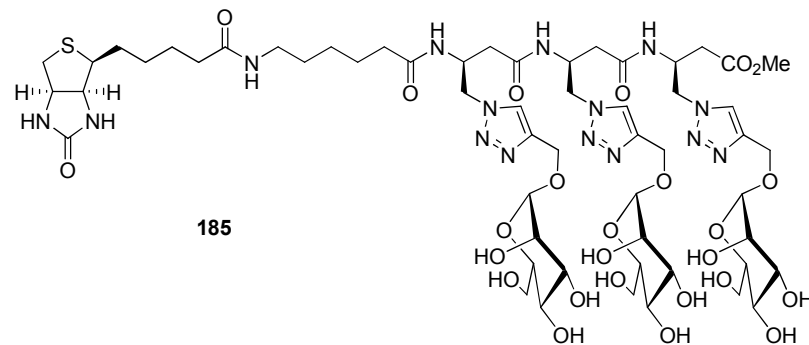
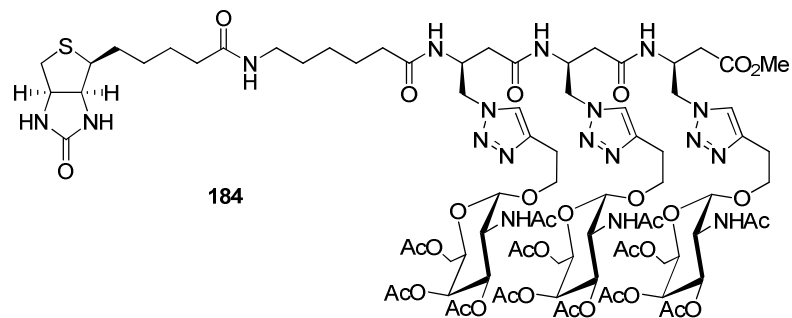
181

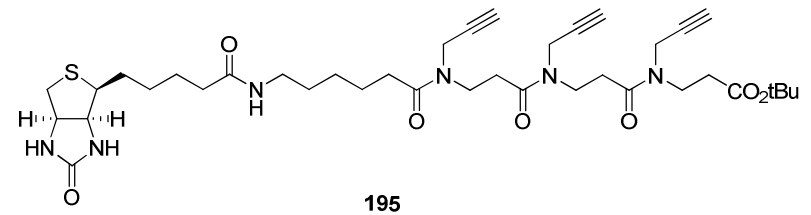
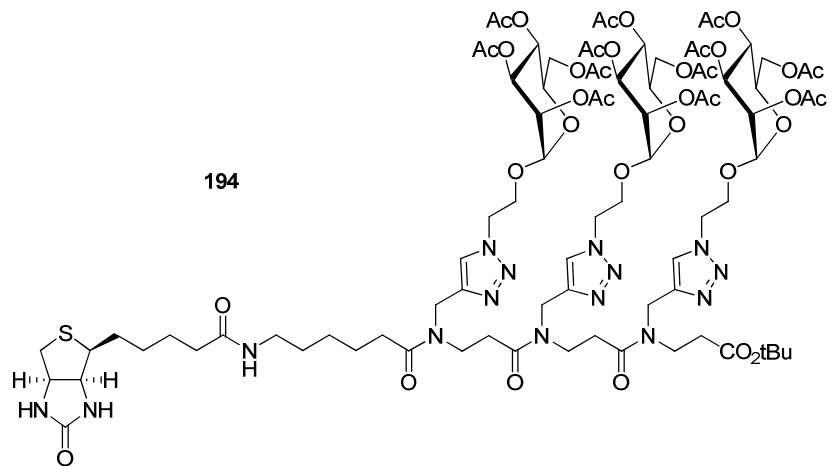
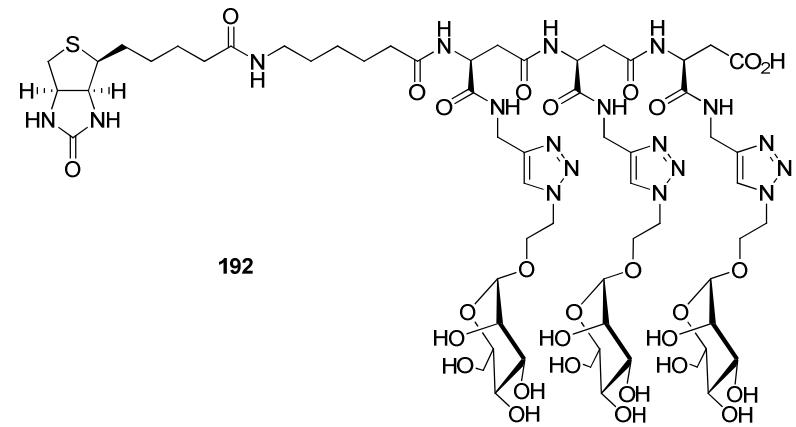
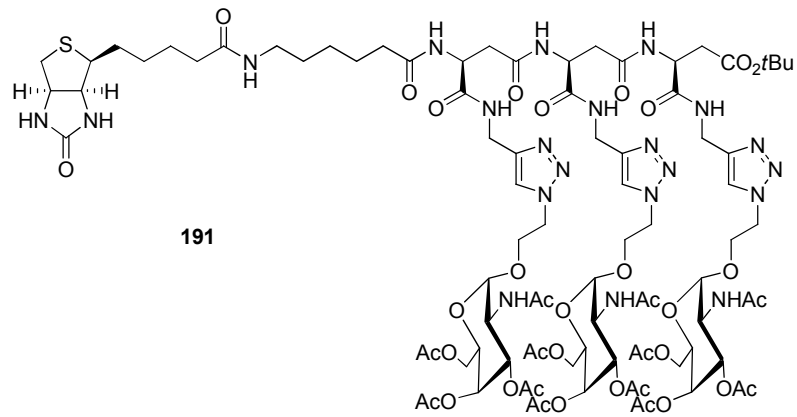


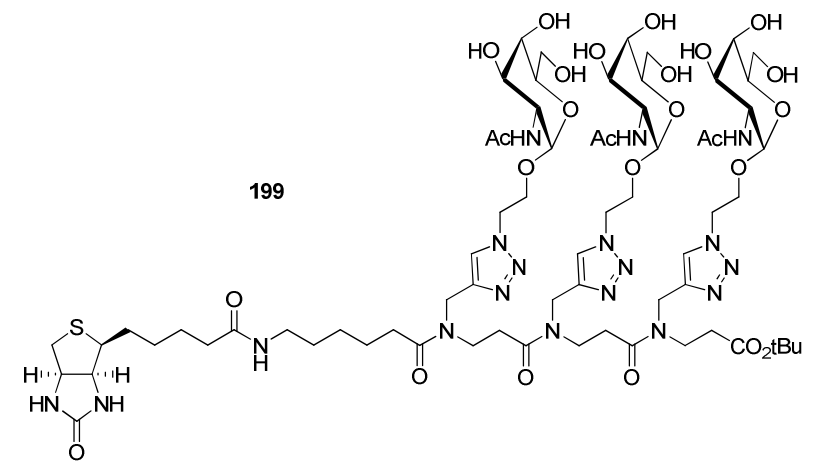
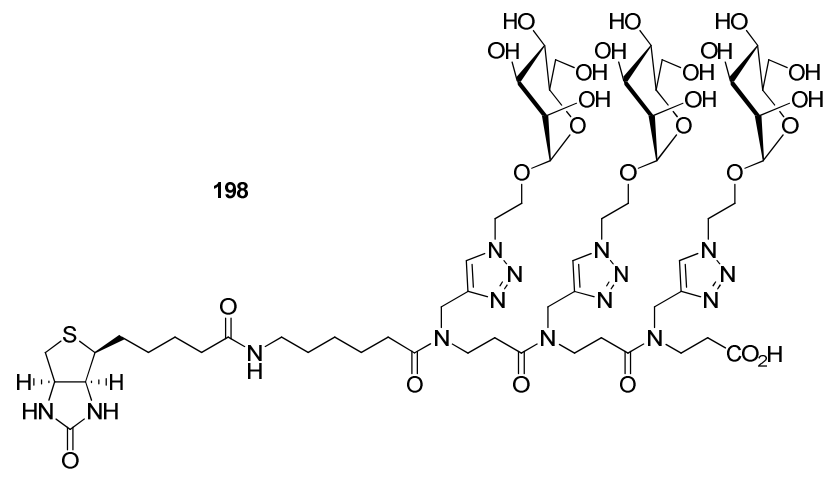
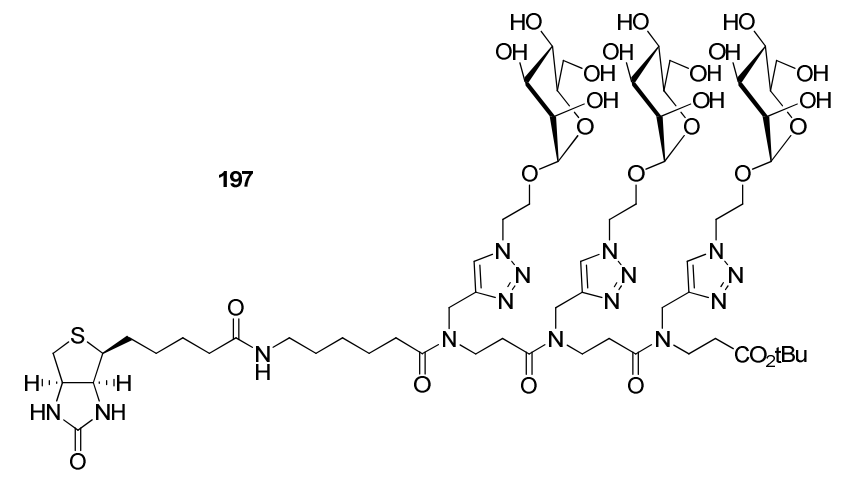
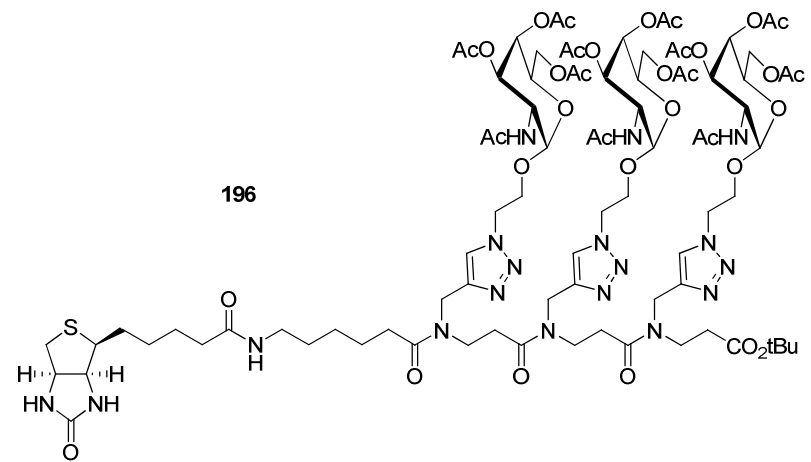
182

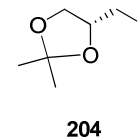
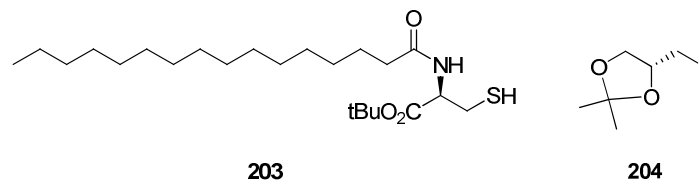
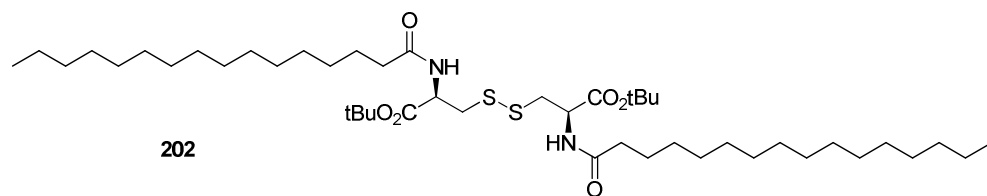
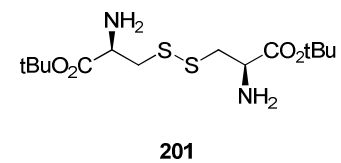
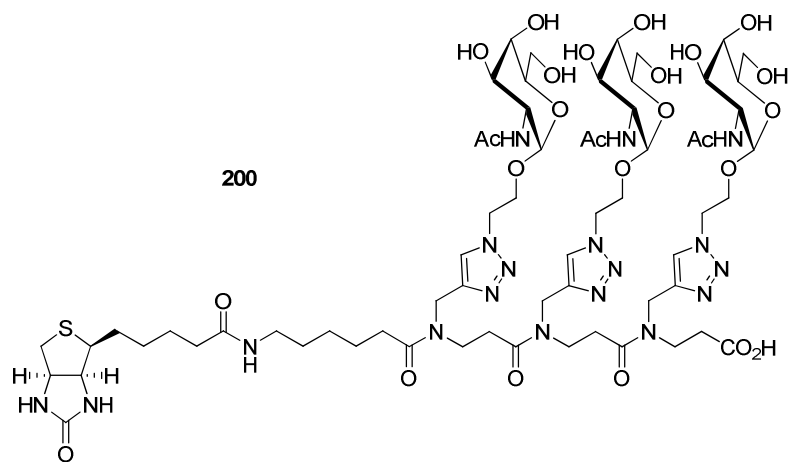


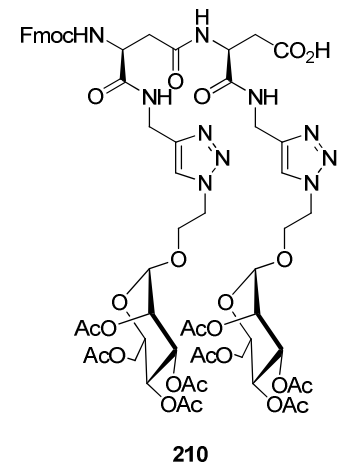
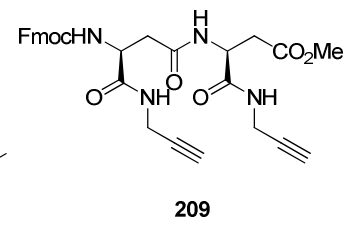
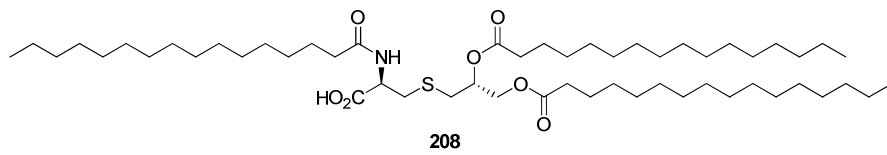
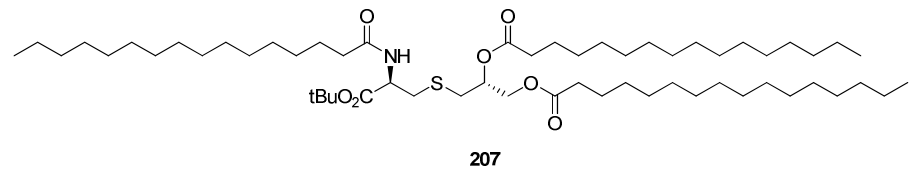
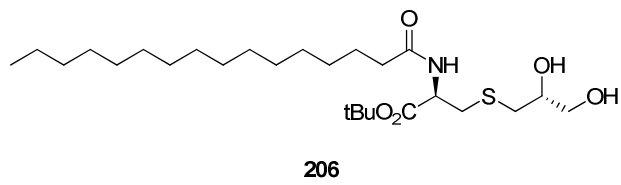
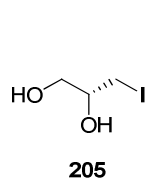
183











BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Goldsby, R. A. ; Kindt, T. J. ; Osborne, B. A. *Immunologie, Le Cours de Janis Kuby* **2001**, Ed. Dunod, 660 p.
- ² Guillot, J. ; Guerry, M. ; Konska, G.; Caldefie-Chezet, F. ; de Latour, M.; Penault-LLorca, F. *Bull. Cancer* **2004**, *91*, 141-158.
- ³ Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- ⁴ Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130; (b) Davis, B. G., *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-601.
- ⁵ Lis, H. ; Sharon, N. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-26.
- ⁶ Montreuil, J. ; Schachter, H. ; Vliegenthart, J. F. G. *Glycoproteins*. Elsevier Science BV: Amsterdam: 1995.
- ⁷ Aksoy, N. ; Faruk Akinci, O. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 483-496.
- ⁸ Singh, A. P. ; Senapati, S. ; Ponnusamy, M. P. ; Jain, M. ; Lele, L. S. ; Davis, J. S. ; Remmenga, S. ; Batra, S. K. *Lancet Oncol.* **2008**, *9*, 1076-1085.
- ⁹ Andrianifahanana, M. ; Moniaux, N. ; Batra, S. K. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, *1765*, 189-222.
- ¹⁰ Taylor-Papadimitriou, J. ; Burchell, J. ; Miles, D. W. ; Dalziel, M. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- ¹¹ Brooks, S. A. ; Carter, T. M. ; Royle, L. ; Harvey, D. J. ; Fry, S. A. ; Kinch, C. ; Dwek, R. A. ; Rudd, P. M. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 2-21.
- ¹² Agrawal, B. ; Krantz, M. J. ; Parker, J. ; Longenecker, B. M. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4079-4081.
- ¹³ Wykes, M. ; MacDonald, K. P. A. ; Tran, M. ; Quin, R. J. ; Xing, P. X. ; Gendler, S. J. ; Hart, D. N. J. ; McGuckin, A. M. *Journal of Leukocyte Biology* **2002**, *72*, 692-701.
- ¹⁴ Ho, S. B. ; Shekels, L. L. ; Toribara, N. W. ; Kim, Y. S. ; Lyftogt, C. ; Cherwitz, D. L. ; Niehans, G. A. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2681-2690.
- ¹⁵ Hollingsworth, M. A. ; Swanson, B. J. *Nat. Rev., Cancer* **2004**, *4*, 45-60.
- ¹⁶ Tarp, M. A. ; Clausen, H. *Biochimica et Biophysica Acta* **2008**, *1780*, 546-563.
- ¹⁷ Karsten, U. ; von Mensdorff-Pouilly, S. ; Goletz, S. *Tumor Biol.* **2005**, *26*, 217-220.
- ¹⁸ Li, Y. ; Liu, D. ; Chen, D. ; Kharbanda, S. ; Kufe, D. *Oncogène* **2003**, *22*, 6107-6110.
- ¹⁹ Yin, L. ; Li, Y. ; Ren, J. ; Kuwahara, H. ; Kufe, D. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278.
- ²⁰ van de Wiel-van Kemenade, E. ; Ligtenberg, M. J. ; de Boer, A. J. ; Buijs, F. ; Vos, H. L. ; Melief, C. J. ; Hilken, J. ; Figdor, C. G. *J. Immunol.* **1993**, *151*, 767-776.
- ²¹ Danishefsky, S. J. ; Allen, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863.
- ²² Bay, S. ; Freire, T. *Revue Francophone des Laboratoires* **2006**, *381*, 39-46.
- ²³ Springer, G. F. *Science* **1984**, *224*, 1198-1206.
- ²⁴ Springer, G. F. ; Cheingsong-Popov, R. ; Schirrmacher, V. ; Desai, P. R. ; Tegtmeyer, H. *The Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 5701-5706.
- ²⁵ Cipolla, L. ; Peri, F. ; Airoldi, C. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 92-121.
- ²⁶ Allison, J. P. ; Hurwitz, A. A. ; Leach, D. R. *Curr. Opin. Immunol.* **1995**, *7*, 682-686.
- ²⁷ Coulie, P. G. ; Brichard, V. ; Van Pel A. ; Wölfel, T. ; Schneider, J. ; Traversari, C. ; Mattei, S. ; De Plaen E. ; Lurquin, C. ; Szikora, J.-P. ; Renauld, J.-C. ; Boon, T. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 35-42.
- ²⁸ Scott, A. M. ; Welt, S. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 717-722.
- ²⁹ Zang, S. ; Graeber, L. A. ; Helling, F. ; Ragupathi, G. ; Adluri, S. ; Lloyd, K. O. ; Linvingston, P. O. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3315-3319.
- ³⁰ Cremer, G.-A. ; Bureaud, N. ; Lelièvre, D. ; Piller, V. ; Piller, F. ; Delmas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6353-6360.
- ³¹ Apostopoulos, V. ; Pieters, G. A. ; Loveland, B. E. ; Sandrin, S. M. ; McKenzie, I. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 10128-10132.

- ³² Ouerfelli, O. ; Warren, J. D. ; Wilson, R. M. ; Danishefsky, S. J. *Experts Rev. Vaccines* **2005**, *4*, 677-685.
- ³³ Cipolla, L. ; Rescigno, M. ; Leone, A. ; Peri, F. ; LaFerla, B. ; Nicotra, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1639-1646.
- ³⁴ Cremer, G.-A. ; Bureaud, N. ; Piller, V. ; Kunz, H. ; Piller, F. ; Delmas, A. F. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968.
- ³⁵ Lundquist, J. L. ; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- ³⁶ Mammen, M. ; Choi, S.-K. ; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- ³⁷ Slovin, S. F. ; Ragupathi, G. ; Musseli, C. ; Olkiewicz, K. ; Verbel, D. ; Kuduk, S. D. ; Schwarz, J. B. ; Sames, D. ; Danishefsky, S. J. ; Livingston, P. O. ; Scher, H. I. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 4292-4298.
- ³⁸ Bethani, I. ; Dasgupta, G. ; Renaudet, O. ; Chentoufi, A. A. ; Zhang, X. ; Carpenter, D. ; Zoon, S. ; Dumy, P. ; BenMohammed, L. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 187-200.
- ³⁹ Lo-Man, R. ; Vichier-Guerre, S. ; Bay, S. ; Dériaud, E. ; Cantacuzène, D. ; Leclerc, C. *The Journal of Immunology* **2001**, *166*, 2849-2854.
- ⁴⁰ Geraci, C. ; Consoli, G. M. L. ; Galante, E. ; Bousquet, E. ; Pappalardo, M. ; Sparado, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 751-758.
- ⁴¹ Ragupathi, G. ; Coltart, D. M. ; Williams, L. J. ; Koide, F. ; Kagan, E. ; Allen, J. ; Harris, C. ; Glunz, P. W. ; Livingston, P. O. ; Danishefsky, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 13699-13704.
- ⁴² Seebach, D. ; Gademann, K. ; Schreiber, J. V. ; Matthews, J. L. ; Hintermann, T. ; Jaun, B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033-2038.
- ⁴³ Schmuck, C. ; Wennemers, H. *Highlights in Bioorganic Chemistry, Methods and Applications* **2004**, Ed. Wiley-VCH, 571 p.
- ⁴⁴ Braekman, J. C. ; Daloz, D. ; Moussiaux, B. ; Riccio, R. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 994-995.
- ⁴⁵ Rehm, B. H. A. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors* **2009** Ed. Caister Academic Press.
- ⁴⁶ Seebach, D. ; Overhand, M. ; Kühnle, F. N. M. ; Martinoni, B. ; Oberer, L. ; Hommel, U. ; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.
- ⁴⁷ Wiegand, H. ; Wirz, B. ; Schweitzer, A. ; Camenisch, G. P. ; Rodriguez Perez, M. I. ; Gross, G. ; Woessner, R. ; Voges, P. I. ; Arvidsson, P. I. ; Frackenhohl, J. ; Seebach, D. *Biopharm. Drug Dispos.* **2002**, *23*, 251-262.
- ⁴⁸ Lind, R. ; Greenshow, D. ; Perry, S. ; Kimmerlin, T. ; Seebach, D. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 1391-1400.
- ⁴⁹ a) Hamuro, Y. ; Schneider, J. P. ; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200-12201 – b) Liu, D. ; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553-7559.
- ⁵⁰ LePlae, P. R. ; Fisk, J. D. ; Porter, E. A. ; Weisblum, B. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6820-6821.
- ⁵¹ Arvidsson, P. I. ; Frackenhohl, J. ; Ryder, N. S. ; Liechty, B. ; Petersen, F. ; Zimmermann, H. ; Camenisch, G. P. ; Woessner, R. ; Seebach, D. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 771-773.
- ⁵² Abele, S. ; Seiler, P. ; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559-1571.
- ⁵³ Poenaru, S. ; Lamas, J. R. ; Folkers, G. ; Lopez De Castro, J. A. ; Seebach, D. ; Rognan, D. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2318-2331.
- ⁵⁴ Gademann, K. ; Kimmerlin, T. ; Hoyer, D. ; Seebach, D. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2460-2468.
- ⁵⁵ Gademann, K. ; Ernst, M. ; Hoyer, D. ; Seebach, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1223-1226.
- ⁵⁶ Gademann, K. ; Ernst, M. ; Seebach, D. ; Hoyer, D. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 16-33.
- ⁵⁷ Werder, M. ; Hauser, H. ; Abele, S. ; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774-1783.
- ⁵⁸ Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180.
- ⁵⁹ Dado, G. P. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054-1062.

- ⁶⁰ Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Karle, I. L. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206-6212.
- ⁶¹ Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Klein, D. A. ; Richards, M. R. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574-7581.
- ⁶² Quinkert, G. ; Egert, E. ; Griesinger, C. *Peptides : Synthesis, Structure and Applications* **1995**, Gutte, B., Ed. ; Academic Press : San Diego.
- ⁶³ Seebach, D. ; Hook, D. F. ; Glätti, A. *Biopolymers* **2006**, *84*, 23-37.
- ⁶⁴ Banerjee, A. ; Balaram, P. *Curr. Science* **1997**, *73*, 1067.
- ⁶⁵ Seebach, D. ; Abele, S. ; Gademann, K. ; Guichard, K. ; Hintermann, T. ; Jaun, B. ; Matthews, J. L. ; Schreiber, J. L. ; Oberer, L. ; Hommel, U. ; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932-941.
- ⁶⁶ Krauthäuser, S. ; Christianson, L. A. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719-11720.
- ⁶⁷ Martinek, T. A. ; Fülöp, R. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3657-3666.
- ⁶⁸ Seebach, D. ; Beck, A. K. ; Bierbaum, D. J. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 1111-1239.
- ⁶⁹ Wang, W. ; Espinosa, J. F. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821-4822.
- ⁷⁰ Claridge, T. D. W. ; Goodman, J. M. ; Moreno, A. ; Angus, D. ; Barker, S. F. ; Taillefumier, C. ; Watterson, M. P. ; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251-4255.
- ⁷¹ Hetenyi, A. ; Mandity, I. M. ; Martinek, T. A. ; Toth, G. K. ; Fülöp, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 547-553.
- ⁷² Doerksen, R. J. ; Chen, B. ; Yuan, J. ; Winkler, J. D. ; Klein, M. L. *Chem. Comm.* **2003**, *20*, 2534-2535.
- ⁷³ a) Cheuguillaume, A. ; Salaün, A. ; Sinbandhit, S. ; Potel, M. ; Gall, P. ; Baudy-Floc'h, M. ; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4923-4929 – b) Lelais, G. ; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 4152-4168.
- ⁷⁴ a) Yang, D. ; Qu, J. ; Li, B. ; Ng, F.-F. ; Wang, X. C. ; Cheung, K.-K. ; Wang, D.-P. ; Wu, Y.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 589-590 – b) Peter, C. ; Daura, X. ; van Gusteren, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7461-7166.
- ⁷⁵ Schmitt, M. A. ; Choi, S. H. ; Guzei, I. A. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4538-4539.
- ⁷⁶ Seebach, D. ; Abele, S. ; Gademann, K. ; Jaun, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1595-1597.
- ⁷⁷ Chung, Y. J. ; Christianson, L. A. ; Stanger, H. E. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10555-10556.
- ⁷⁸ Tang, C.-K. ; Sheng, K.-C. ; Apostopoulos, V. ; Pietersz, G. A., *Experts Rev. Vaccines* **2008**, *7*, 1005-1018
- ⁷⁹ Denda-Nagai, K. ; Kubota, N. ; Tsuiji, M. ; Kamata, M. ; Irimura, T., *Glycobiology* **2002**, *12* (443-450)
- ⁸⁰ A. Cambi ; Figdor, C. G., *Curr. Cell. Biol.* **2003**, *15*, 539-546
- ⁸¹ Lam, J. S. ; Mansour, M. K. ; Specht, C. A. ; Levitz, S. M., *J. Immunol.* **2005**, *175*, 7496-7503
- ⁸² Engering, A. J. ; Cella, M. ; Fluitsma, D. ; Brockhaus, M. ; Hoefsmit, E. C. ; Lanzavecchia, A. ; Pieters, G. A., *J. Immunol.* **1997**, *27*, 2417-2425
- ⁸³ (a) GrandJean, C. ; Rommens, C. ; Gras-Masse, H. ; O., M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1068-1072; (b) Srinivas, O. ; Larrieu, P. ; Duverger, E. ; Boccaccio, C. ; Bousser, M.-T. ; Monsigny, M. ; Fonteneau, J.-F. ; Jotereau, F. ; Roche, A.-C., *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1547-1554; (c) Sheng, K. C. ; Kalkanidis, M. ; Pouniotis, D. S. ; Esparon, S. ; Tang, C. K. ; Apostopoulos, V. ; Pietersz, G. A., *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 424-436
- ⁸⁴ Saeland, E. ; van Vliet, S. J. ; Bäckström, M. ; van der Berg, V. C. M. ; Geijtenbeek, T. B. H. ; Meijer, G. A. ; Y., v. K., *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1225-1236

- ⁸⁵ a) Shi, Y. ; Zheng, W. ; Rock, K. L. *Proc. Natl. Am. Sci. USA* **2000**, *97*, 14590-14595 – b) Sauter, B. ; Albert, M. L. ; Fransisco, L. ; Larsson, M. ; Somersan, S. ; Bhardwaj, N. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 423-433
- ⁸⁶ Sancho, D. ; Joffre, O. P. ; Keller, A. M. ; Rogers, N. C. ; Martínez, D. ; Hernanz-Falcón, P. ; Rosewall, I. ; Reis e Sousa, C. *Nature* **2009**, *458*, 899-903
- ⁸⁷ Higashi, N.; Fujioka, K.; Denda-Nagai, K.; Hashimoto, S.-I.; Nagai, S.; Sato, T.; Fujita, Y.; Morikawa, A.; Tsuiji, M.; Miyata-Takeuchi, M.; Sano, Y.; Suzuki, N.; Yamamoto, K.; Matsushima, K.; Irimura, T., *J. Biol. Chem.* **2002**, *227*, 20686-20693
- ⁸⁸ Vliet, S. J. V.; Aarnoudse, C. A.; M., B.-v. d. B. V. C.; Boks, M.; Geijtenbeek, T. B. H.; van Kooyk, Y., *International Immunol.* **2007**, *37*, 2075-2081
- ⁸⁹ (a) Suzuki, N.; Yamamoto, K.; Toyoshima, S.; Osawa, T.; Irimura, T., *J. Immunol.* **1996**, *156*, 128-135; (b) Yamamoto, K.; Ishida, C.; Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Konami, Y.; Osawa, T.; Irimura, T., *Biochemistry* **1994**, *33*, 8159-8166
- ⁹⁰ Napoletano, C.; Rughetti, A.; P., A. T. M.; Coleman, J.; Benett, E. P.; Picco, G.; Sale, P.; Denda-Nagai, K.; Irimura, T.; Mandel, U.; Clausen, H.; Frati, L.; J., T.-P.; Burchell, J.; Nuti, M., *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8358-8367
- ⁹¹ Nakada, H. ; Inoue, M. ; Numata, Y. ; Tanaka, N. ; Funokoshi, I. ; Fukui, S. ; Mellors, A. ; Yamashina, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2495-2499
- ⁹² Hamper, B. C. ; Kolodziej, S. A. ; Scates, A. M. ; Smith, R. G. ; Cortez, E. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 708-718
- ⁹³ Astle, J. M.; Udugamasooriya, D. G.; Smallshaw, J. E.; Kodadek, T., *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 223-227
- ⁹⁴ Thumshirn, G. ; Hersel, U. ; Goodman, S. L. ; Kessler, H. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717-2725
- ⁹⁵ (a) Shao, J. ; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *117*, 3893-3899 – (b) Rose, K. ; Zeng, W. ; Regamey, P. O. ; Chernushevich, I. V. ; Standing, K. G. ; Gaertner, H. F. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 552-556
- ⁹⁶ Nardin, E. H. ; Calvo-Calle, J. M. ; Oliveira, G. A. ; Nussenzweig, R. S. ; Schneider, M. ; Tiercy, J. M. ; Loutan, L. ; Hochstrasser, D. ; Rose, K. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 481-489
- ⁹⁷ Reichel, F.; Roelofsen, A. M.; Geurts, H. P. M.; Hämäläinen, T. I.; Feiters, M. C.; Boons, G.-J., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989-7997
- ⁹⁸ (a) Zhu, W.; Ramos, T. V.; Gras-Masse, H.; Kaplan, B. E.; BenMohammed, L., *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 3102-3114; (b) Grabiec, A.; Meng, G.; Fichte, S.; Bessler, W.; Wagner, H.; Kirschning, C., *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (48004-48012).
- ⁹⁹ Knutson, K. L. ; Disis, M. L. *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, *54*, 721-728
- ¹⁰⁰ Bode, J. W. ; Fox, R. M. ; Baucom, K. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252.
- ¹⁰¹ a) Rademann, J. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4654-4656 – b) Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4554-4556.
- ¹⁰² Carillo, N. ; Davalos, E. A. ; Russak, J. A. ; Bode, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1452-1453.
- ¹⁰³ Vasella, A., *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1273-1285.
- ¹⁰⁴ a) Fässler, R. ; Frantz, D. E. ; Oetiker, J. ; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3054-3056 – b) Kasahara, K. ; Iida, H. ; Kibayashi, C. *J. Org. Chem* **1989**, *54*, 2225-2233.
- ¹⁰⁵ Basha, A. ; Henry, R. ; McLaughlin, M. A ; Ratajczyk, J. D. ; Wittenberger, S. J. *J. Org. Chem* **1994**, *59*, 6103-6106.
- ¹⁰⁶ Wenkert, E. ; Alonso, M. E. ; Buckwalter, B. L. ; Sanchez, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2021-2029.
- ¹⁰⁷ Adams, T. C. ; Combs, D. W. ; Daves, G. D. ; Hauser, F. M. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4582-4584
- ¹⁰⁸ a) Omura, K. ; Swern, D. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660 – b) Mancuso, A. J. ; Huang, S. L. ; Swern, D. *J. Org. Chem* **1978**, *43*, 2480-2482.

- ¹⁰⁹ Sohn, S. S. ; Bode, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6021-6024
- ¹¹⁰ Grossman, R. B. ; Comesse, S. ; Rasne, R. M. ; Hattori, K. ; Delong, M. N. *J. Org. Chem* **2003**, *68*, 871-874.
- ¹¹¹ Simoneau, B. ; Brassard, P. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 1015-1022
- ¹¹² Hall, M. J. ; McDonnell, S. O. ; Killoran, J. ; O'Shea, D. F. *J. Org. Chem* **2005**, *70*, 5571-5579.
- ¹¹³ Griesbaum, K. ; Jung, I. C. ; Mertens, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6024-6027
- ¹¹⁴ Hoaglin, R. I. ; Kubler, D. G. ; Montagna, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5460-5463.
- ¹¹⁵ Trost, B. ; Dumas, J. ; Villa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9836-9845.
- ¹¹⁶ a) Goodman, M. ; Boardman, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2483-2490 – b) García-Martín, M. G. ; García-Alvarez, M. ; Martínez de Ilarduya, A. ; Campos, L. ; Galbis, J. A. ; Muñoz-Guerra, S. *Biopolymers* **2005**, *77*, 121-127 – c) Matthews, J. L. ; Gademann, K. ; Jaun, B. ; Seebach, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 3331-3340.
- ¹¹⁷ El Marini, A. ; Roumestant, M. L. ; Viallefont, P. ; Razafindramboa, D. ; Bonato, M. ; Follet, M. *Synthesis* **1992**, *11*, 1104-1108.
- ¹¹⁸ Sanda, F. ; Terada, K. ; Masuda, T. *Macromolécules* **2005**, *38*, 8149-8154.
- ¹¹⁹ Stathopoulos, P. ; Papas, S. ; Kostidis, S. ; Tsikaris, V. *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 658-664.
- ¹²⁰ a) Jones J. ; *Amino Acid And Peptide Synthesis* **1992**, *45*, Oxford Science Publications – b) Mergler, M. ; Dick, F. ; Sax, B. ; Stähelin, C. ; Vorherr, T. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 518-526 – c) Mergler, M. ; Dick, F. *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 650-657.
- ¹²¹ Karlström, A. ; Undén A. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *48*, 305-311.
- ¹²² Martinez, J. ; Bodansky, M. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, *12*, 277-283.
- ¹²³ Taillefumier, C. ; Thielges, S. ; Chapleur, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2213-2224.
- ¹²⁴ Mayato, C. ; Dorta, R. L. ; Vásquez, J. T. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *49*, 1396-1398 .
- ¹²⁵ Exemples d'ouverture d'anhydrides : a) Huang, X. ; Luo, X. ; Roupioz, Y. ; Keillor, J. W. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8821-8825 – b) Lapidus, M. ; Sweeney, M. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 163-166 – c) Fuganti, C. ; Grasselli, P. ; Malpezzi, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1126-1128.
- ¹²⁶ Kiessling, F. ; Heilmann, M. ; Lammers, T. ; Ulbrich, K. ; Subr, V. ; Peschke, P. ; Waengler, B. ; Mier, W. ; Schrenk, H.-H. ; Bock, M. ; Schad, L. ; Semmler, W. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 42-51.
- ¹²⁷ Spatola, A. F. ; Crozet, Y. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3842-3846.
- ¹²⁸ a) Yang, C.-P. ; Su, C.-S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5186-5191 – b) Huang, X. ; Luo, X. ; Roupioz, Y. ; Keillor, J. W. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8821-8825.
- ¹²⁹ Neises, B. ; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1978**, *17*, 522-523.
- ¹³⁰ Matthews, J. L. ; Gademann, K. ; Jaun, B. ; Seebach, D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, *20*, 3331-3340
- ¹³¹ Debenham S. D. ; Snyder, P. W. ; Toone, E. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5805-5811.
- ¹³² Meinke, P. T. ; Arison, B. ; Culberson, J. C. ; Fisher, M. H. ; Mrozik, H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2591-2596
- ¹³³ Xue, C. ; Mirkin C. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2039-2042.
- ¹³⁴ a) Karlström, A. ; Undén, A. E. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4243-4246 – b) Karlström, A. ; Undén, A. E. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3909-3912 .
- ¹³⁵ Pietrzik, N. ; Schips, C. ; Ziegler, T. *Synthesis* **2008**, 519-526.
- ¹³⁶ a) Ahmed, S. ; Beleid, R. ; Sprules, T. ; Kaur, K. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 25-28 – b) Kaur, K. ; Sprules, T. ; Soliman, W. ; Beleid, R. ; Ahmed, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 658-665
- ¹³⁷ Shimamoto, K. ; Ishida, M. ; Shinozaki, H. ; Ohfuné, Y. *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 4167-4176
- ¹³⁸ Markidis, T. ; Kokotos, G. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1919-1923.
- ¹³⁹ Santoyo-González, F. ; Torres-Pinedo, A. ; Sánchez-Ortega, A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4409-4414.

- ¹⁴⁰ Stephen, A. ; Hashimi, K. ; Rudolph, M. ; Schymura, S. ; Visus, J. ; Frey, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4905-4909.
- ¹⁴¹ Caba, J. M. ; Rodrigues, I. M. ; Manzanares, I. ; Giralt, E. ; Albericio, F. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7568-7574.
- ¹⁴² ten Brink, H. T. ; Rijkers, D. S. ; Liskamp, R. M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1817-1824.
- ¹⁴³ Hjelmggaard, T. ; Tanner D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1796-1805.
- ¹⁴⁴ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28.
- ¹⁴⁵ Greck, C. ; Bischoff, L. ; Ferreira, F. ; Genêt J. P. *J. Org. Chem.* **2005**, *60*, 7010-7012.
- ¹⁴⁶ May, J. P. ; Brown, L. J., van Delft, I. ; Thelwell, N. ; Harley, K. ; Brown, T. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2534-2542.
- ¹⁴⁷ PCT Int. Appl. (WO) 9967192, 29 décembre 1999.
- ¹⁴⁸ Madder, A. ; Li, L. ; De Muynck, H. ; Farcy, N. ; Van Haver, D. ; Fant, F. ; Vanhoenacker, G. ; Sandra, P. ; Davis, A. P. ; De Clercq, P. J. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 552-562.
- ¹⁴⁹ Genêt, J. P. ; Blart, E. ; Savignac, M. ; Lemeune, S. ; Lemaire-Audoire, S. ; Bernard, J. M. *Synlett* **1993**, *9*, 680-682.
- ¹⁵⁰ Genêt, J. P. ; Savignac, M. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 305-317.
- ¹⁵¹ Mandal, P. K. ; McMurray, J. S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6599-6601.
- ¹⁵² Palmer, J. T. ; Rydzewski, R. M. ; Mendonca, R. V. ; Sperandio, D. ; Spencer, J. R. ; Kirschbein, B. L. ; Lohman, J. ; Beltman, J. ; Nguyenn M. ; Liu, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3434-3439.
- ¹⁵³ a) Dessolin, M. ; Guillerz, M.-G. ; Thieriet, N. ; Guilbé, F. ; Loffet, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5741-5744 – b) Foillard, S. ; Rasmussen, M. O. ; Razkin, J. ; Bituryn, D. ; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
- ¹⁵⁴ Decostaire, I. P. ; Lelièvre, D. ; Zhang, H. ; Delmas, A. F. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7057-7060.
- ¹⁵⁵ Roy, O. ; Faure, S. ; Thery, V. ; Didierjean C. ; Taillefumier, C. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 921-924.
- ¹⁵⁶ Liu, L. ; Li, C. P. ; Cochran, S. ; Ferro, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2221-2226.
- ¹⁵⁷ Hasegawa, T. ; Numata, M. ; Okumura, S. ; Kimura, T. ; Sakurai, K. ; Shinkai, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2404-2412.
- ¹⁵⁸ Roy, R. ; Kim, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 369-372.
- ¹⁵⁹ Lemieux, R. U. ; Ratcliffe, R. M. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- ¹⁶⁰ Kozikowski, A. P. ; Lee, J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863-870.
- ¹⁶¹ Liu, M. ; Young Jr, V. G. ; Lohani, S. ; Live, D. ; Barany, G. *Carbohydrate Res.* **2005**, *340*, 1273-1285.
- ¹⁶² Kuduk, S. D. ; Schwarz, J. B. ; Chen, X.-T. ; Glunz, P. W. ; Sames, D. ; Ragupathi, G. ; Livingston, P. O. ; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12474-12485
- ¹⁶³ Eberling, J. ; Braun, P. ; Kowalczyk, D. ; Schultz, M. ; Kunz, H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2638-2646
- ¹⁶⁴ Norgren, A. S. ; Arvidsson, P. I. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1359-1361.
- ¹⁶⁵ Norgren, A. S. ; Geitmann, M. ; Danielson, U. H. ; Arvidsson P. I. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 132-138.
- ¹⁶⁶ Norgren, A. S. ; Arvidsson, P. I. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5272-5278.
- ¹⁶⁷ Inaba, Y. Kawakami, T. ; Aimoto, S. ; Ikegami, T. ; Takeuchi, T. ; Nakazawa, T. ; Yano, S. ; Mikata, Y. *Carbohydrate Res.* **2009**, *344*, 613-626.
- ¹⁶⁸ Böttcher, C. ; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4224-4226.
- ¹⁶⁹ Simpson, G. L. ; Gordon, A. H. ; Lindsay, D ; M. ; Promsawan, N. ; Crump, M. P. ; Mulholland, K. ; Hayter, B. ; R. ; Gallagher, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10638-10639.
- ¹⁷⁰ Cheng, R. P. ; Gellman, S. H. ; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.
- ¹⁷¹ Virta, P. ; Karsela, M. ; Lönnberg, H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1989-1999.
- ¹⁷² Huisgen, R. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613-628.

- ¹⁷³ Bock, V. D. ; Hiemstra, H. ; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Chem.* **2006**, *1*, 51-68.
- ¹⁷⁴ Rostovstev, V. V. ; Green, L. G. ; Fokin, V. V. ; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599
- ¹⁷⁵ Tornøe, C. W. ; Christensen, C. ; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- ¹⁷⁶ Kolb, H. C. ; Finn, M. G. ; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- ¹⁷⁷ Fazio, F. ; Bryan, M. C. ; Blixt, O. ; Paulson, J. C. ; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402
- ¹⁷⁸ Streicher, B. ; Wünsch, B. *Carbohydrate Research* **2003**, *338*, 2375-2385.
- ¹⁷⁹ Khanetskyyn, B. ; Dallinger, D. ; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 884-892.
- ¹⁸⁰ Perez-Balderas, F. ; Ortega-Munoz, M. ; Morales-Sanfrutos, J. ; Hernandez-Mateo, F. ; Calvo-Flores, F. G. ; Calvo-Asin, J. A. ; Isac-Garcia, J. ; Santoyo-Gonzales, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951-1954.
- ¹⁸¹ Vichier-Guerre, S. ; Lo-Man, R. ; Huteau, V. ; Dériaud, E. ; Leclerc, C. ; Bay, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3567-3570.
- ¹⁸² Allen, J. R. ; Harris, C. R. ; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1890-1897.
- ¹⁸³ Nicolaou, K. C. ; Hwang, C.-K. ; Duggan, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6682-6690.
- ¹⁸⁴ Lo-Ma, R. ; Vichier-Guerre, S. ; Perrault, R. ; Dériaud, E. ; Huteau, V. ; BenMohammed, L. ; Diop, O. M. ; Livingston, P. O. ; Bay, S. ; Leclerc, C. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4987-4884 et références citées.
- ¹⁸⁵ Skander, M. ; Humbert, N. ; Collot, J. ; Gradinaru, J. ; Klein, G. ; Loosli, A. ; Sauser, J. ; Zocchi, A. ; Gilardoni, F. ; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411-14418
- ¹⁸⁶ Fara, M. A. ; Díaz-Mochón, J. J. ; Bradley, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1011-1014.
- ¹⁸⁷ Wiesmüller, K.-H. ; Bessler, W. ; Jung., G. *Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 593-606.
- ¹⁸⁸ Reichel, F. ; Roelofsen, A. M. ; Geurts, H. P. M. ; Hämäläinen, T. I. ; Feiters, M. C. ; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989-7997
- ¹⁸⁹ Kawakami, Y. ; Asai, T. ; Umeyama, K. ; Yamashita, Y. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3581-3585
- ¹⁹⁰ Lo-Man, R. ; Vichier-Guerre, S. ; Bay, S. ; Dériaud, E. ; Cantacuzène, D. ; Leclerc, C. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2849-2854
- ¹⁹¹ Lo-Man, R. ; Bay, S. ; Vichier-Guerre, S. ; Dériaud, E. ; Cantacuzène, D. ; Lerclerc, C. *Cancer Research* **1999**, *59*, 1520-1524
- ¹⁹² Chothia, C. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 537-572.
- ¹⁹³ Gademann, K. ; Jaun, B. ; Seebach, D. ; Perozzo, R. ; Scapozza, L. ; Folkers, G. *Helv. Chim Acta* **1999**, *82*, 1-11.
- ¹⁹⁴ Chakraborty, T. K. ; Jataprakash, S. ; Srinivasa, P. ; Chary, M. G. ; Diwan, P. V. ; Nagaraj, R. ; Sankar, A. R. ; Kunwar, A ; C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8167-8171.
- ¹⁹⁵ Llinas, M. ; Klein, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4731-4737.
- ¹⁹⁶ Andersen, N. H. ; Neidigh, J. W. ; Harris, S. M. ; Lee, G. M. ; Liu, Z. ; Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547-8561.
- ¹⁹⁷ Baxter, N. J. ; Williamson, M. P. *Journal of Biomolecular NMR* **1997**, *9*, 359-369.
- ¹⁹⁸ M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.
- ¹⁹⁹ Llinas, M. ; Klein, M.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4731-4737.
- ²⁰⁰ Holzwarth, G. M. ; Doty, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 218-228.
- ²⁰¹ Berova, N. ; Nakanishi, K. ; Woody, R. W. *Circular Dichroism, Principles and Applications 2nd Ed.* Wiley-VCH **2000**.
- ²⁰² McReynolds, K. D. ; Gervay-Hague, J. *Tetrahedron Asymetry* **2000**, *11*, 337-362.
- ²⁰³ Berova, N. ; Di Bari, L. ; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914-931.
- ²⁰⁴ McReynolds, K. D. ; Gervay-Hague, J. *Tetrahedron Asymetry* **2000**, *11*, 337-362.
- ²⁰⁵ Glaetti, A. ; Daura, X. ; Seebach, van Gunsteren W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972-12978.
- ²⁰⁶ Arvidsson, P. I. ; Frackenpohl, J. ; Seebach, D. *Helv Chim. Acta* **2003**, *86*, 1522-1553.

-
- ²⁰⁷ Kong, J. ; Yu, S. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549-559.
- ²⁰⁸ Neel, J. *Pure Appl. Chem.* **1972**, *31*, 201-25.
- ²⁰⁹ Seebach, D. ; Mathad, R. I. ; Kimmerlin, T. ; Mahajan, Y. R. ; Bindschädler, P. ; Rueping, M. ; Jaun, B. ; Hilty, C. ; Etezady-Esfarjani, T. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 1969-1982.
- ²¹⁰ Rueping, M. ; Mahajan, Y. R. ; Jaun, B. ; Seebach, D. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 1607-1615
- ²¹¹ Raguse, T. L. ; Lai, J. R. ; Gellman, S. H. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4154-4164
- ²¹² Seebach, D. ; Overhand, M. ; Kühnle, F. N. M. ; Martinoni, B. ; Oberer, L. ; Hommel, U. ; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.
- ²¹³ Ferry, John D. *Viscoelastic Properties of Polymers*. New York: Wiley, **1980**, p. 529.
- ²¹⁴ Peppas, N. A. ; Hilt, J. Z. ; Khademhosseini, A. ; Langer, R. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345-1360.
- ²¹⁵ Elemans, J. A. A. W. ; Rowan, A. E. ; Nolte, R. J. M. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2661-2670.
- ²¹⁶ Hanabusa, K. ; Tanaka, R. ; Suzuki, M. ; Kimura, M. ; Shirai, H. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 1095-1097.
- ²¹⁷ Makarevic, J. ; Jokic, M. ; Peric, M. ; Tomišić, V. ; Kojic-Prodic, B. ; Zinic, M. *Chem. - Eur. J.* **2001**, *7*, 3328-3341.
- ²¹⁸ Hirst, A. R. ; Smith, D. K. *Langmuir* **2004**, *20*, 10851-10857.
- ²¹⁹ Yan, X. ; Cui, Y. ; He, Q. ; Wang, K. ; Li, J. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1522-1526.
- ²²⁰ Lee, K. Y. ; Mooney, D. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869-1880.
- ²²¹ Xing, B. ; Yu, C. W. ; Chow, K. H. ; Ho, P. L. ; Fu, D. ; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14846-14847
- ²²² Tiller, J. C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3072-3075.
- ²²³ Kiyonaka, S. ; Sugiyasu, K. ; Shinkai, S. ; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10954-10955.
- ²²⁴ Jayawarna, V. ; Ali, M. ; Jowitt, T. A. ; Miller, A. F. ; Saiani, A. ; Gough, J. E. ; Ulijn, R. V. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 611-614.
- ²²⁵ Yang, Z. ; Liang, G. ; Ma, M. ; Abbah, A. S. ; Lu, W. W. ; Xu, B. *Chem. Commun.* **2007**, 843-845.
- ²²⁶ Yang, Z. ; Liang, G. ; Ma, M. ; Gao, Y. ; Xu, B. *Small* **2007**, *3*, 558-562.
- ²²⁷ Das, A. K. ; Collins, R. ; Ulijn, R. V. *Small* **2008**, *4*, 279-287.
- ²²⁸ Das, A. K. ; Bose, P. P. ; Drew, M. G. B. ; Banerjee, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7432-7442.
- ²²⁹ Breed, D. R. ; Thibault, R. ; Xie, F. ; Wang, Q. ; Hawker, C. J. ; Pine, D. J. *Langmuir* **2009**, *25*, 4370-4376.
- ²³⁰ Daz, D. D. ; Rajagopal, K. ; Strable, E. ; Schneider, J. ; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6056-6057.
- ²³¹ Tzokova, N. ; Fernyhough, C. M. ; Topham, P. D. ; Sandon, N. ; Adams, D. J. ; Butler, M. F. ; Armes, S. P. ; Ryan, A. L. *Langmuir* **2009**, *25*, 2479-2485.

RESUME

Les β -peptides montrent une grande stabilité métabolique et protéolytique. Ce travail s'est principalement focalisé sur leur utilisation en tant que plateformes multivalentes pour la présentation de « sucres » et en particulier d'antigènes saccharidiques spécifiques des tumeurs, connus sous le nom de TACAs (*Tumor-Associated Carbohydrate Antigen*). Les TACAs, et parmi eux l'antigène Tn (GalNAc- α -O-Ser/Thr), sont considérés comme des marqueurs des cellules tumorales qui peuvent être intégrés dans des structures synthétiques destinées à mimer la surface des cellules cancéreuses en vue d'induire une réponse immunitaire antitumorale. Dans la première partie de la thèse, nous avons étudié la synthèse de β -peptides glycoconjugués, obtenus par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre entre un alcyne et un azoture (CuAAC – *Copper-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*). Ces glycoconjugués, présentant jusqu'à six unités saccharidiques, ont été élaborés à partir de β -peptides fonctionnalisés par des groupes azoture ou alcyne, préparés au départ d'acide aspartique. Les trimères glycoconjugués ont également été couplés à de la biotine, par l'intermédiaire d'un espaceur (d'acide aminocaproïque) et l'antigénicité de ces édifices a été testée. Les β -peptides présentent également une tendance prononcée à adopter des structurations secondaires. C'est pourquoi les oligomères synthétisés ont été étudiés d'un point de vue conformationnel afin de déterminer la nature d'une éventuelle préférence conformationnelle.

SUMMARY

β -peptides show a high stability towards proteolytic and metabolic processes. This work has been focused mainly on their use as multivalent platforms for the presentation of various carbohydrates, in particular tumor specific antigenic carbohydrate patterns, the so-called TACAs (*Tumor-Associated Carbohydrate Antigen*). TACAs, and among them the Tn antigen (GalNAc- α -O-Ser/Thr), are considered as cancer cells markers which can be integrated into fully synthetic structures aimed at mimicking tumor cells surface to induce an antitumoral immunologic response. In the first part of the thesis, the synthesis of β -peptides glycoconjugates, using the Copper-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) has been investigated. These glycoconjugates containing up to six carbohydrate moieties have been elaborated from azide- and alkyne-functionnalized β -peptides prepared from aspartic acid. The trimers of these glycoconjugated β -peptides were also coupled to biotine through an aminocaproic spacer and the constructs were tested for their antigenicity. Besides this, β -peptides exhibit a high tendency to adopt secondary structures. That's why a conformational analysis of the β -peptide oligomers synthesized was carried out to determine the nature of a potential structuration.