



HAL
open science

Etude de l'allergie aux antibiotiques : synthèse de peptides antigéniques

Noémie Scornet

► **To cite this version:**

Noémie Scornet. Etude de l'allergie aux antibiotiques : synthèse de peptides antigéniques. Chimie organique. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS032 . tel-01647216

HAL Id: tel-01647216

<https://theses.hal.science/tel-01647216>

Submitted on 24 Nov 2017

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.

NNT : 2015SACLS032

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat : Chimie des substances naturelles

Par

Mme Noémie Scornet

Etude de l'allergie aux antibiotiques : synthèse de peptides antigéniques

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 6 novembre 2015 :

Composition du Jury :

Mr, Poupon, Erwan, Professeur, Université Paris-Sud
Mr, Lecouvey, Marc, Professeur, Université Paris Nord
Mme, Papini, Anna-Maria, Professeure, Université Cergy-Pontoise
Mr, Terreux, Raphaël, Professeur, Université Lyon 1
Mme, Joseph, Delphine, Professeure, Université Paris-Sud
Mr, Pallardy, Marc, Professeur, Université Paris-Sud

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Le professeur Marc Lecouvey et le professeure Anna-Maria Papini pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le professeur Erwan Poupon et le professeur Raphaël Terreux pour bien vouloir examiner ce travail.

Un grand merci à mes directeurs de thèse les professeurs Delphine Joseph et Marc Pallardy pour leurs conseils et pour m'avoir suivie et assistée tout au long de ma thèse. Merci également à tous les deux pour avoir pris du temps pour corriger ce manuscrit et parfaire les messages que je souhaitais passer. En particulier, toute ma gratitude revient au professeure Delphine Joseph, qui m'a encadrée au quotidien, et qui m'a beaucoup appris pendant ces trois dernières années. Elle a su se rendre disponible malgré ses autres charges de travail et je l'en remercie. Ses nombreux conseils et les connaissances qu'elle m'a transmises ont su me conduire à l'achèvement de ce travail, j'en sors grandie.

Je remercie bien sûr Marie Eliane Azoury, ma co-thésarde biologiste qui a également dédié sa thèse à ce sujet. Merci pour nos nombreux échanges ainsi que pour son aide lors de la synthèse des bioconjugués. Je lui souhaite un bon courage pour finir sa thèse et bonne continuation pour son avenir. Une pensée également à Rami Bechara qui va prendre la suite de son travail, et pour toute l'équipe de biologistes de l'étage qui a subi mes longues périodes de centrifugation.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les collaborateurs de ce projet sans qui rien n'aurait été possible. Le professeur Raphaël Terreux et le docteur Julie-Anne Chemelle pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et initiée à la modélisation de dynamique moléculaire, ainsi que pour leur travail sur les dites modélisations. Merci également au docteur Bernard Maillère pour les modélisations *via* le logiciel IEDB, et aux docteurs Emmanuel Nony et Maxime Le Mignon pour les analyses de spectrométrie de masse. Je tiens également à gratifier les docteurs Robert Thai et Vincent Dive, directeur du Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines au CEA de Saclay, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et m'avoir fait découvrir le MALDI-ToF. Merci également aux docteurs Cathy Nhim et Sandrine Delarue-Cochin pour leurs travaux antérieurs sur mon sujet de thèse. Pour finir, je remercie le docteur Luc de Chaisemartin et le professeure Sylvie Chollet-Martin pour avoir apporté leurs expertises au cours de certaines de nos réunions.

Toute ma gratitude au docteur Bruno Figadère, directeur de BioCIS, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Merci à Claire Troufflard et Camille Dejean pour les analyses de RMN ainsi qu'à Karine Leblanc pour les analyses de spectrométrie de masse et pour l'aide apportée à la mise en place des conditions de chromatographie préparative.

Egalement, un grand merci à toute notre équipe de pharmacognosie et plus particulièrement aux docteurs Sandrine Delarue-Cochin et Emmanuelle Drège avec lesquelles j'ai partagé mes trois

dernières années au quotidien ainsi que le docteur Nicolas Gigant qui a partagé mon laboratoire l'année dernière. Merci à eux et tous les stagiaires pour leur présence lors de nos réunions du lundi matin. Je remercie également toute l'équipe de BioCIS pour leur accueil, leur aide lors de la recherche de produits, et leur sympathie. Merci pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon sujet lors des séminaires BioCIS. Je remercie également toute l'équipe de chimie analytique avec laquelle j'ai effectué mes heures de monitorat et en particulier le docteur Ali Tfayli pour avoir orchestré mes emplois du temps.

J'adresse également toute ma gratitude à tous mes professeurs et encadrants de stage qui m'ont beaucoup appris pendant ma scolarité. Merci pour leur aide, leurs idées et leurs conseils et pour avoir partagé avec moi leurs expériences et leur savoir. Je remercie particulièrement les docteurs Damien Hérault et Laurent Giordano, mes encadrants de stage à l'iSm2 de Marseille. Merci également au professeur Yves Troin et aux docteurs Pierre Chalard et Isabelle Thomas, mes enseignants de chimie organique à l'école nationale supérieure de chimie de Clermont-Ferrand. Enfin, une pensée aux professeurs René Clément et Giang Vo-Thanh, enseignants à l'IUT de chimie d'Orsay, sans qui je n'en serais pas là.

Une reconnaissance particulière pour l'aide logistique et la bonne humeur dans le laboratoire apportée par le docteur Pierre-Etienne Venot tout au long de ma thèse. Un grand merci à Sara Vallerotto, future docteure qui aura bien mérité son titre, avec qui j'ai beaucoup partagé. Merci également au docteur Johan Fenneteau pour ses conseils avisés, ainsi que Pierre Daligaux et Eric Buchy pour leurs bonnes idées. Merci à tous pour ces bons moments passés ensemble. Je tiens également à remercier Hamza Boufroua pour son humour décalé qui m'aura enchantée au cours de ma première année de thèse. Merci également au docteur Sylvain Petit pour son soutien, son calme et son humour qui ont enjolivé ma deuxième année. Et enfin, merci à Long Nguyen, Linh Nguyen et Elvis Otogo qui ont su égayer ma dernière année de thèse.

Merci à Barbara Tessier, ma première stagiaire qui était vraiment parfaite dans ce rôle et à qui j'ai adoré faire découvrir mon travail et mon projet. De même, un grand merci à Fatma Sahli qui a également travaillé sur l'étude de l'allergie au sulfaméthoxazole et à qui je souhaite bonne chance pour la suite de ses études.

Je tiens également à remercier ma famille pour leur soutien, en particulier ma mère et mes deux sœurs Anaïs et Justine, à qui je dois beaucoup. Merci également à mon père, mes grands-parents, mon oncle Eric, Dominique, Sabine, ma cousine Aude, et toutes mes belles-familles qui m'ont épaulée pendant ces trois ans.

Pour finir, merci à tous mes amis qui m'ont soutenue, de près ou de loin, pendant cette épreuve de ma vie. Je tiens particulièrement à citer Claire, Aurélie, Lucie, Marion, Didier, Aurélien... Et merci à tous ceux que je n'ai pas cités ici, mais qui comptent pour moi.

ABREVIATIONS

aa : acide aminé
ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
Alloc : allyloxy-carbonyle
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APA (6-APA) : acide 6-aminopénicillanique
APTS : acide *para*-toluènesulfonique
AX : amoxicilline
Boc : *tert*-butyloxy-carbonyle
BME : β -mercaptoéthanol
Bn : benzyle
Bz : benzoyle
CAST : test de stimulation leucocytaire (de l'anglais : cellular antigen stimulation test)
cat. : quantité catalytique
Cbz (Z) : benzyloxy-carbonyle
CCM : chromatographie sur couche mince
CD : cyclodextrine
CHARMM : ensemble de champs de force utilisés en dynamique moléculaire (de l'anglais : chemistry at Harvard molecular mechanics)
CLEA : agrégats d'enzymes inter-liés (de l'anglais : cross-linked enzyme aggregates)
CMH (angl. MHC) : complexe majeur d'histocompatibilité (angl. major histocompatibility complex)
conc. : concentré
conv. : conversion
DB : banque de données (de l'anglais : database)
DBN : 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DC : cellules dendritiques (de l'anglais : dendritic cells)
DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DCDMH : 2,4-dichloro-5,5-diméthylhydantoïne
DCE : dichloroéthane
DCM : dichlorométhane
DCU : 1,3-dicyclohexylurée
DDJ : dose définie journalière
DIB : diacétoxy-iodobenzène
DIC : *N,N'*-diisopropylcarbodiimide
DIEA : diisopropyléthylamine
DMA : *N,N*-diméthylaniline

DMAC : *N,N*-diméthylacétamide
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
Dpm : diphénylméthyle
DRESS : syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (de l'anglais : drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms)
DTT : dithiothréitol
ed : excès diastéréomérique
EDCI : chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ee : excès énantiomérique
ELISpot : de l'anglais : enzyme-linked immunosorbent spot
EP : éponge à proton : 1,8-bis(diméthylamino)naphtalène
FAH₂ : anion dihydrofolate
FAH₄ : anion tétrahydrofolate
Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbone
GM-CSF : facteur de croissance des granulocytes et macrophages (de l'anglais : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GP : groupement protecteur
HBTU : hexafluorophosphate de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium
HLA : antigène des leucocytes humains (de l'anglais : human leucocyte antigen)
HOBt : hydroxybenzotriazole
HNE : 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal
HPLC : chromatographie liquide haute performance (de l'anglais : high performance liquid chromatography)
HSA : albumine du sérum humain (de l'anglais : human serum albumin)
IBCP : institut de biologie et chimie des protéines
IEDB : banque de données d'épitopes immuns (de l'anglais : immune epitope database) (tools.immuneepitope.org/main)
Ig : immunoglobuline (anticorps)
IL : interleukines
IMGT® : système d'information international sur les agents du système immunitaire (ImMunoGeneTics : www.imgt.org)
iTRAQ : marquage isobare pour la quantification relative et absolue (de l'anglais : isobaric tag for relative and absolute quantitation)
LB : lymphocyte B
LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (de l'anglais : liquid chromatography – mass spectrometry)
LogP : logarithme du coefficient de partage octane/eau

LPS : lypopolysaccharide

LT : lymphocyte T

MALDI : désorption/ionisation laser assistée par une matrice (de l'anglais : matrix-assisted laser desorption/ionisation)

m-CPBA : acide *mé*ta-chloroperbenzoïque

MMPP : monoperoxyphthalate de magnésium

Mmt : mono-méthoxytrityle (4-méthoxytrityle)

Moc : méthoxycarbonyle

Moz : *para*-méthoxybenzyloxycarbonyle

MS : spectrométrie de masse

MS/MS : spectrométrie de masse tandem

NAG : *N*-acétylglucosamine

NAMA : acide *N*-acétylmuramique

NAMD : dynamique moléculaire à échelle nanoscopique (de l'anglais : nanoscale molecular dynamics)

N.C. : non communiqué

NCS : *N*-chlorosuccinimide

NegC : contrôle négatif (de l'anglais : negative control)

NMP : *N*-méthylpyrrolidone

OMS (angl. WHO) : organisation mondiale de la santé (angl. world health organization)

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique (de l'anglais : peripheral blood mononuclear cells)

PBS : tampon phosphate avec sels (de l'anglais : phosphate buffered saline)

PDB : banque de données des protéines (de l'anglais : protein data bank) (www.rcsb.org/pdb/home/home.do)

PG : pénicilline G ou benzylpénicilline

p-i concept : interaction pharmacologique avec les récepteurs immuns (de l'anglais : pharmacologic interaction with immune receptors)

PMB : *para*-méthoxybenzyle

PME : algorithme d'évaluation des interactions électrostatiques (de l'anglais : particle mesh Ewald)

Pom : pivaloyloxyméthyle

PTMSE : (2-phényl-2-triméthylsilyl)éthyle

Rdt : rendement

Rf : rapport frontal pour les CCM

RMN (angl. NMR) : résonance magnétique nucléaire (angl. nuclear magnetic resonance)

RMSD : écart quadratique moyen (de l'anglais : root mean square deviation)

sat. : solution saturée

SMX : sulfaméthoxazole

SMX-HA : sulfaméthoxazole hydroxylamine

SMX-NO : *N*-nitroso-sulfaméthoxazole

SMX-NO₂ : *N*-nitro-sulfaméthoxazole

TA (angl. rt) : température ambiante (angl. room temperature)

TcR : récepteur des lymphocytes T (de l'anglais : T-cell receptor)

TCT : 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TIC : courant ionique total (de l'anglais : total ion current)

TIS : triisopropylsilane

TM : tamis moléculaire

TMS : triméthylsilyle

TMSE : 2-(triméthylsilyl)éthyle

ToF : analyseur à temps de vol (time-of-flight)

Trt : trityle

TTL : test de transformation lymphocytaire

T°C : température

UA : unité arbitraire

U.V. : ultra-violet

VMD : logiciel de visualisation de dynamique moléculaire (de l'anglais : visual molecular dynamics)

WT : type naturel, sans modification (de l'anglais : wild-type)

SOMMAIRE

Remerciements	3
Abréviations	5
Sommaire	9
Liste des schémas	13
Liste des figures	19
Liste des tableaux	21
Introduction	25
I. Généralités sur les allergies médicamenteuses	27
1) Les mécanismes de l'allergie médicamenteuse	28
2) La théorie de l'haptène	30
3) Le diagnostic d'une réaction allergique	32
4) Le traitement des allergies	33
II. Antibiotiques étudiés responsables d'allergies	35
1) Pénicilline G	36
a) L'histoire de la pénicilline	37
b) La production de la pénicilline	38
c) Le mode d'action des pénicillines	42
d) Le mode d'hapténisation	45
2) Amoxicilline	48
a) L'histoire de l'amoxicilline	48
b) Synthèse industrielle	49
c) Le mode d'action de l'amoxicilline	54
d) Le mode d'hapténisation de l'amoxicilline	55
3) Sulfaméthoxazole	55
a) L'histoire du sulfaméthoxazole	55
b) Synthèse industrielle	56
c) Le mode d'action du sulfaméthoxazole	57
d) Les modes de présentation du sulfaméthoxazole aux lymphocytes T	59
III. Projet de recherche	61

1) Etude sur une protéine modèle _____	61
a) Etat de l'art _____	61
b) Conclusion _____	66
2) Prédiction des peptides potentiellement immunogènes : les épitopes _____	67
3) Méthode de synthèse des épitopes à disposition _____	73
a) Etat de l'art _____	73
b) Conclusion _____	80
Présentation des travaux _____	83
Chapitre I : Identification de peptides immunogènes issus des pénicillines _____	85
I. Etude de l'hapténisation de la HSA par les pénicillines, pénicilline G et amoxicilline _____	85
1) Synthèse des bioconjugués HSA-pénicilline (pénicilline G et amoxicilline) _____	86
2) Spectrométrie de masse sur les bioconjugués _____	87
a) Analyse par spectrométrie de masse des bioconjugués HSA-PG _____	88
b) Analyse par spectrométrie de masse des bioconjugués HSA-AX _____	90
c) Conclusion _____	93
3) Détermination des acides aminés hapténisés par la pénicilline G et l'amoxicilline _____	94
a) Identification des acides aminés modifiés sur les bioconjugués HSA-PG _____	95
b) Identification des acides aminés modifiés sur le bioconjugué HSA-AX _____	98
4) Conclusion sur la recherche des acides aminés hapténisés _____	102
II. Sélection <i>in silico</i> des peptides potentiellement épitopes _____	103
1) Modélisation par le logiciel IEDB MHC-II-binding _____	104
2) Modélisation par simulation de dynamique moléculaire _____	108
3) Conclusion sur la sélection des peptides _____	110
III. Synthèse des monomères _____	113
1) Synthèse du monomère Lys-PG _____	113
a) Choix des groupements protecteurs _____	114
b) Ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline G par des lysines _____	123
c) Etude de l'épimérisation de la pénicilline G en solution _____	126
d) Protection de l'amine endocyclique _____	131
e) Déprotection de la fonction acide carboxylique de la lysine _____	134
f) Conclusion sur la synthèse du monomère Lys-PG _____	138

2) Synthèse du monomère Lys-AX _____	140
a) Choix des groupements protecteurs _____	141
b) Ouverture du cycle β -lactame par la lysine _____	149
c) Clivage du groupement allyle _____	153
d) Clivage des groupements 9-fluorénylméthoxycarbone _____	154
e) Conclusion sur la synthèse du monomère Lys-AX _____	155
3) Conclusion sur la synthèse des monomères Lys-PG et Lys-AX _____	157
IV. Conclusion _____	157
V. Tests biologiques des peptides synthétisés _____	158
Chapitre II : Identification de peptides immunogènes issus du sulfaméthoxazole _____	163
I. Etude de l'hapténisation de la HSA par le sulfaméthoxazole _____	163
1) Synthèse des métabolites du sulfaméthoxazole _____	164
2) Synthèse du bioconjugué HSA-SMX _____	165
3) Conclusion _____	166
II. Sélection <i>in silico</i> des peptides potentiellement épitopes _____	166
1) Modélisation par le logiciel IEDB MHC-II-binding _____	167
2) Conclusion sur la sélection des peptides _____	169
III. Synthèse du monomère Cys-SMX _____	170
1) Choix des groupements protecteurs _____	171
a) Protection par un ester d'allyle _____	172
b) Protection par un ester de <i>para</i> -méthoxybenzyle _____	173
c) Clivage du groupement <i>tert</i> -butylthio _____	174
2) Protection de l'acide carboxylique de la Fmoc-Cys(Mmt)-OH _____	177
a) Protection par un ester d'allyle _____	177
b) Protection par un ester de benzyle _____	178
3) Clivage du groupement 4-méthoxytrityle _____	178
4) Oxydation/chloration du dérivé thiol en chlorure de sulfonyle _____	179
a) Etude bibliographique _____	179
b) Essai d'oxydation/chloration sur l'ester d'allyle de cystéine _____	186
c) Oxydation/chloration sur l'ester de benzyle de cystéine _____	187
d) Reproduction du mode opératoire de la publication de Joyard <i>et al.</i> _____	190

e) Tests sur la réactivité du sulfaméthoxazole _____	190
f) Tests de l'oxydation de Joyard <i>et al.</i> avec des substrats proches du SMX _____	193
g) Clivage du groupement benzyle _____	195
h) Essais de synthèse du monomère Cys-SMX _____	196
5) Changement de stratégie _____	198
6) Nouvelle voie de synthèse <i>via</i> l'utilisation de groupements protecteurs peu labiles _____	202
a) Protection en acétamide et ester de méthyle _____	202
b) Substitution de l'acide sulfonique en chlorure de sulfonyle _____	202
c) Synthèse du sulfonamide à partir de l'acide sulfonique _____	204
7) Conclusion et perspectives sur la synthèse du monomère _____	204
IV. Conclusion _____	206
Conclusion et perspectives _____	209
Références bibliographiques _____	217

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Principe général de la phase d'initiation d'une réaction allergique _____	29
Schéma 2 : Synthèse de l'histamine (1) à partir de la <i>L</i> -histidine (3) et son inhibition par la tritoqualine (2) _____	34
Schéma 3 : Tentatives de fermeture du cycle β -lactame par Sheehan et ses collaborateurs ⁷⁷ _____	38
Schéma 4 : Fermeture du β -lactame sur le dérivé phtalimide (11) puis oxydation du soufre en sulfone par Sheehan et ses collaborateurs ⁷⁷ _____	39
Schéma 5 : Synthèse totale de la pénicilline V (14) par Sheehan et ses collaborateurs ^{79,80} _____	40
Schéma 6 : Biosynthèse de la pénicilline G (7) ^{81,90} _____	41
Schéma 7 : Structure chimique de la <i>N</i> -acétyl- <i>D</i> -glucosamine (26) et de l'acide <i>N</i> -acétylmuramique (27) et leur enchaînement (28) _____	42
Schéma 8 : Liaison entre deux chaînes de peptidoglycane par l'action de la transpeptidase ⁹¹ _____	43
Schéma 9 : Isostérie entre la <i>D</i> -alanine- <i>D</i> -alanine (29) et la pénicilline G (7), suivi de son ouverture par les résidus sérines de la transpeptidase conduisant à l'inhibition de l'enzyme _____	44
Schéma 10 : Hapténisation de la pénicilline G (7) par ouverture du β -lactame par les acides aminés amino-terminaux d'une protéine _____	45
Schéma 11 : Mécanisme de formation de l'acide pénicillénique (30) à partir de la pénicilline G (7), en milieu acide _____	46
Schéma 12 : Métabolisation de la pénicilline G (7) en milieu aqueux acide _____	47
Schéma 13 : Formation du déterminant antigénique majeur épimérisé en passant par l'acide pénicillénique (30) _____	47
Schéma 14 : Différentes voies d'accès aux pénicillines hémisynthétiques _____	50
Schéma 15 : Synthèse chimique du 6-APA (33) par Weissenburger ¹¹⁵ _____	51
Schéma 16 : Synthèse chimique de l'amoxicilline (4) d'après le brevet de Nayler et Smith ¹¹¹ _____	52
Schéma 17 : Synthèse de l'amoxicilline (4) selon le brevet de Love ¹²⁰ _____	53
Schéma 18 : Synthèse industrielle du SMX (5) ¹³¹ _____	57
Schéma 19 : Synthèse du FAH ₄ (51) à partir du FAH ₂ (50) <i>via</i> la dihydrofolate réductase _____	57
Schéma 20 : Structures isostères entre le sulfanilamide (45) et l'acide <i>p</i> -aminobenzoïque (52), précurseur du FAH ₂ (50) _____	58
Schéma 21 : Hapténisation du métabolite nitroso du sulfaméthoxazole (54) par les dérivés cystéines oxydés d'une protéine (A) ou par le glutathion (55) (B) ¹³⁵ _____	60
Schéma 22 : Mécanisme de fragmentation d'une protéine par CNBr ^{146,147} _____	62
Schéma 23 : Mécanisme supposé de l'hapténisation d'une protéine par Yamana <i>et al.</i> ¹⁵¹ _____	63
Schéma 24 : Exemple de thiolation d'un dérivé amine _____	65
Schéma 25 : Liaison d'un dérivé sous forme hydroxylamine à une protéine puis oxydation du dérivé sulfinamide en dérivé sulfonamide _____	66

Schéma 26 : Représentation générale d'un épitope (en rose) lié au niveau d'un HLA d'une cellule dendritique (en rouge et vert) et présenté à un lymphocyte T <i>via</i> son TcR (en bleu et orange) (PDB : 1J8H) ¹⁶⁴ _____	67
Schéma 27 : Oxydation de la <i>p</i> -phénylènediamine (59) en 1,4-benzoquinonediimine (60) ²⁰¹ _____	73
Schéma 28 : Modification de sérines par la méthode de Boto Castro <i>et al.</i> ²⁰³ _____	75
Schéma 29 : Modification des dérivés lysines en position α - et ϵ -aminée d'après Hennrich <i>et al.</i> ²⁰⁴ _____	75
Schéma 30 : Modifications spécifiques des ϵ -amino des lysines sur des peptides avec une lysine <i>N</i> -terminale (65) d'après la méthode de Hennrich <i>et al.</i> ²⁰⁴ _____	76
Schéma 31 : Action du réactif iTRAQ sur un peptide (73) menant à un mélange de produits souhaités (74) et (75) et secondaires (76), (77) et (78) ²⁰⁶ _____	77
Schéma 32 : Modification de deux sérines d'un peptide (79) par protections/déprotections orthogonales ²⁰³ _____	78
Schéma 33 : Modification d'un peptide (82) par des nanocristaux de cellulose (83) ²⁰⁷ _____	79
Schéma 34 : Synthèse d'un acide aminé modifié (89) par la méthode de Boto Castro <i>et al.</i> ²⁰³ _____	80
Schéma 35 : Type d'acide aminé synthétisé pour cette étude : FmocHN-aa(antibiotique)-COOH _____	81
Schéma 36 : Déterminant antigénique de la pénicilline G (7) observé expérimentalement avec la coupure représentant l'adduit de masse observé à <i>m/z</i> 160 en bleu et <i>m/z</i> 217 en rouge et bleu, incluant la perte de la chaîne latérale et de la protéine _____	95
Schéma 37 : Déterminant antigénique de l'amoxicilline (4) observé expérimentalement avec la coupure représentant l'adduit de masse observé à <i>m/z</i> 160 en bleu et <i>m/z</i> 349 en rouge et bleu avec la perte de l'amine primaire et de la protéine _____	99
Schéma 38 : Formation des quatre diastéréoisomères possibles par le passage par l'acide amoxicillénique (90) ou par un intermédiaire plus stable (91) _____	101
Schéma 39 : Rétrosynthèse du monomère Lys-PG protégé (92) _____	114
Schéma 40 : Choix des groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Lys(pénicilline G protégée)-OH (92) _____	115
Schéma 41 : Protection de l'acide 7-aminocéphalosporanique (98) en ester de <i>tert</i> -butyle (99) d'après Stedman ²²⁶ _____	115
Schéma 42 : Protection de l'acide carboxylique de la pénicilline G (7) en ester de <i>para</i> -méthoxybenzyle (100) _____	116
Schéma 43 : Protection de la Fmoc-Lys-OH (96) en ester d'allyle (102) sous forme de sel de chlorure _____	117
Schéma 44 : Déprotection de l'ester méthylique sur les peptides (103) et (104) à l'aide de la thermitase d'après Reissmann et Greiner ²³³ _____	118
Schéma 45 : Déprotection sélective du groupement méthyle ou 9-fluorénylméthoxycarbonyle sur des acides aminés (107) en fonction de la proportion AlCl ₃ / <i>N,N</i> -diméthylaniline (DMA) d'après la publication de Di Gioia et ses collaborateurs ²³⁴ _____	118
Schéma 46 : Formation de l'espèce active entre AlCl ₃ et la DMA d'après Di Gioia <i>et al.</i> ²³⁴ _____	119

Schéma 47 : Mécanisme de la S_N2 désalkylante et les types de nucléophiles possibles, un petit groupement protecteur est nécessaire à la formation de l'intermédiaire à 5 centres _____	119
Schéma 48 : S_N2 désalkylante sur les acides aminés (111) avec Lil d'après une publication de Biron et Kessler ²⁴⁰ _____	120
Schéma 49 : Déprotection sélective des esters de la chaîne principale des acides aminés (113) par l'Alcalase-CLEA d'après Nuijens <i>et al.</i> ²⁴³ _____	120
Schéma 50 : Déprotection sélective des ester et éther de TMSE du pentasaccharide (115) d'après Taylor <i>et al.</i> ²⁴⁴ _____	121
Schéma 51 : Mécanisme de clivage du groupement TMSE par le $BF_3 \cdot Et_2O$ postulé par Jansson <i>et al.</i> ²⁴⁵ _____	122
Schéma 52 : Couplage entre le sucre (117) et la Fmoc-Ser-OAll (118) en présence de $BF_3 \cdot Et_2O$ sans provoquer le clivage du groupement Fmoc d'après Motiei <i>et al.</i> ²⁴⁶ _____	122
Schéma 53 : Protection de la Fmoc-Lys(Z)-OH (120) en ester de TMSE sous forme de sel de chlorure (122) et de sel d'acétate (123) en deux étapes _____	123
Schéma 54 : Réaction ayant menée à l'obtention d'un mélange de deux diastéréoisomères du produit (126) _____	127
Schéma 55 : Rétrosynthèse du composé (127) _____	128
Schéma 56 : Synthèse du sel d'acétate de 6-aminohexanoate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (128) à partir de l'acide 6-aminohexanoïque (129) _____	129
Schéma 57 : Synthèse du composé (127) : outil de la détermination du centre épimérisé _____	130
Schéma 58 : Optimisation de la réaction d'ouverture de la pénicilline G protégée en ester de PMB (100) par le sel d'acétate du 6-aminohexanoate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (128) _____	131
Schéma 59 : Protection de l'amine endocyclique des composés (124), (125) et (126) par le carbamate de benzyle _____	133
Schéma 60 : Tentative de clivage du groupement méthyle par une S_N2 désalkylante d'après le mode opératoire de Biron et Kessler. ²⁴⁰ _____	134
Schéma 61 : Tentative de clivage du groupement 2-(triméthylsilyl)éthyle en présence de trifluorure de bore étherate _____	135
Schéma 62 : Déprotection sélective du groupement allyle sur la Fmoc-Cys(TMSE)-OAll (138) à l'aide de palladium tétrakis(triphénylphosphine) et du dérivé <i>N,N'</i> -diméthyle de l'acide barbiturique d'après un brevet de Nishimura et Shimawaki ²⁵⁷ _____	135
Schéma 63 : Clivage du groupement allyle du composé (135) avec du palladium tétrakis(triphénylphosphine) et de l'acide barbiturique. _____	136
Schéma 64 : Mécanisme de clivage du groupement allyle par le palladium tétrakis(triphénylphosphine) et l'acide barbiturique ²⁵⁶ _____	137
Schéma 65 : Clivage du groupement allyle sur le composé (125) dans les conditions de Nishimura et Shimawaki _____	138
Schéma 66 : Récapitulatif de la synthèse du monomère Lys-PG (140) _____	139
Schéma 67 : Rétrosynthèse du monomère Lys-AX protégé (141) _____	140

Schéma 68 : Choix des groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Lys(amoxicilline protégée)-OH (141)	141
Schéma 69 : Protections des amines primaires en carbamate de <i>tert</i> -butyle d'après Zang <i>et al.</i> sur la glycine (144) (A), ²⁶⁰ et d'après Verma <i>et al.</i> sur l'acide <i>ortho</i> -aminobenzoïque (145) (B) ²⁶¹	142
Schéma 70 : Protection des acides aminés (144), (148), (149) et (150) en <i>N</i> -Boc (146), (155), (156) et (157) d'après Ponnusamy et ses collaborateurs ²⁶²	143
Schéma 71 : Protection de l'amoxicilline (4) par le groupement diphénylméthyle d'après Hakimelahi <i>et al.</i> ²⁶³	145
Schéma 72 : Synthèse de l'amoxicilline <i>N</i> -Boc (143) à partir de l'amoxicilline (4)	146
Schéma 73 : Protection de l'acide carboxylique du 6-APA (33) par un groupement pivaloyloxyméthyle d'après Favre <i>et al.</i> ²⁶⁴	147
Schéma 74 : Clivage du groupement allyle sur le mélange 80/20 d'amoxicilline ouverte par la lysine en mono-et di-Fmoc (163) et (165)	154
Schéma 75 : Déprotection des groupements Fmoc du mélange 80/20 des monomères mono- et di-Fmoc (166) et (167)	155
Schéma 76 : Récapitulatif de la synthèse du monomère Lys-AX (166)	156
Schéma 77 : Protocole d'évaluation de l'immunogénicité des peptides, breveté par Bernard Maillère et Stéphanie Delluc Desroches ²⁶⁹	159
Schéma 78 : Synthèse des métabolites du SMX (5) : le SMX-HA (53) et SMX-NO (54)	164
Schéma 79 : Analogie entre la réactivité du dérivé SMX-NO (54) avec une protéine-SH ou -SOH	170
Schéma 80 : Rétrosynthèse du monomère Cys-SMX (173) à partir d'une cystéine commerciale <i>N</i> -Fmoc et <i>S</i> -protégée par un groupement R ₂ (176)	171
Schéma 81 : Choix des groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Cys(SMX)-OH (173)	172
Schéma 82 : Protection de la cystéine commerciale (177) en ester de para-méthoxybenzyle(179) et isolation du produit secondaire (180)	173
Schéma 83 : Mécanisme d'obtention du produit secondaire (180) lorsque la DMAP n'est pas présente dans le milieu (voies rouge et noire) comparé au mécanisme avec DMAP (voie bleue)	174
Schéma 84 : Déprotection de la fonction <i>tert</i> -butylthio sur la cystéine ester de <i>para</i> -méthoxybenzyle (179)	175
Schéma 85 : Déprotection de la fonction <i>tert</i> -butylthio par le Bu ₃ P menant au composé Fmoc-Ala-OAll (183)	175
Schéma 86 : Mécanisme de déprotection du groupement <i>tert</i> -butylthio avec β-élimination de la fonction thiol d'après Rijkers <i>et al.</i> ²⁷⁷	176
Schéma 87 : Déprotection du groupement <i>tert</i> -butylthio sur les peptides (188) et (189) d'après Postma <i>et al.</i> ²⁷⁸	176
Schéma 88 : Choix des nouveaux groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Cys(SMX)-OH (173)	177

Schéma 89 : Protection de la fonction acide carboxylique de la cystéine commerciale (192) en ester d'allyle (193)	178
Schéma 90 : Protection de la fonction acide carboxylique de la cystéine commerciale (192) en ester de benzyle (194)	178
Schéma 91 : Clivage du groupement 4-méthoxytrityle sur les cystéines esters d'allyle (193) et de benzyle (194)	179
Schéma 92 : Oxydation de la fonction thiol du composé (196) en acide sulfonique (197) d'après Sureshbabu et ses collaborateurs ²⁹⁵	179
Schéma 93 : Oxydation de la cystéine (22) en acide cystéique (198) par le MMPP d'après Zheng et Richardson ²⁹⁶	180
Schéma 94 : Synthèse du chlorure de sulfonyle (208) à partir du dérivé thiol (206) en telescoping d'après Enders et Moll ³⁰⁴	182
Schéma 95 : Mécanisme d'oxydation/chloration en présence d'eau oxygénée et d'Y-Cl ₂ (Y = TiCl ₂ , ZrCl ₂ ou SO) d'après Bahrami <i>et al.</i> ³⁰⁵⁻³⁰⁷	183
Schéma 96 : Mécanisme d'oxydation/chloration en présence de KNO ₃ et de SO ₂ Cl ₂ présenté par Park <i>et al.</i> ³⁰⁹	184
Schéma 97 : Oxydation de Joyard <i>et al.</i> sur la Fmoc-Cys(Trt)-OMe (221) avec du <i>t</i> -BuOCl ³¹⁵	186
Schéma 98 : Tentative d'oxydation/chloration de la cystéine ester d'allyle (182) en chlorure de sulfonyle (224)	186
Schéma 99 : Tentative d'oxydation puis de chloration du composé (195) en deux étapes	188
Schéma 100 : Synthèse de l'hypochlorite de <i>tert</i> -butyle à partir de l'alcool <i>tert</i> -butylique	188
Schéma 101 : Synthèse de la cystéine <i>N</i> -Fmoc- <i>S</i> -Mmt ester de méthyle (230)	190
Schéma 102 : Synthèse de la cystéine benzylaminosulfonyle (223) en suivant le mode opératoire décrit par Joyard <i>et al.</i> ³¹⁵	190
Schéma 103 : Etude du couplage entre la cystéine ester de benzyle (195) et l'aniline (235)	193
Schéma 104 : Etude du couplage entre la cystéine ester de benzyle (195) et la <i>para</i> -nitroaniline (84)	194
Schéma 105 : Synthèse de la Fmoc-Cys-OBn sulfonamide de sulfaméthoxazole (231)	197
Schéma 106 : Synthèse des sulfonamides (242) et (243) à l'aide d'une quantité catalytique de β-cyclodextrine d'après Sridhar <i>et al.</i> ³²⁰	198
Schéma 107 : Tentative de synthèse du sulfonamide de sulfaméthoxazole (231) <i>via</i> un couplage entre la cystéine (195) et les métabolites (53) (54) du SMX suivi d'une oxydation	199
Schéma 108 : Deuxième voie rétrosynthétique possible pour la formation du sulfonamide (231)	199
Schéma 109 : Synthèse du sulfonamide primaire (245) à partir du thiol (195)	200
Schéma 110 : Méthode de couplage de Tan et ses collaborateurs ³²³	200
Schéma 111 : Mécanisme de couplage au cuivre proposé par Tan et ses collaborateurs ³²³	200
Schéma 112 : Tentative de synthèse du sulfonamide (236) par la méthode de Tan <i>et al.</i> ³²³	201
Schéma 113 : Nouvelle stratégie : synthèse du sulfonamide <i>N</i> -acétyl et ester de méthyle (254)	201
Schéma 114 : Synthèse de l'acide cystéique protégé (256)	202

Schéma 115 : Autre stratégie de synthèse du sulfonamide (173) envisageable _____	205
Schéma 116 : Autre stratégie d'obtention du sulfonamide (231) _____	205
Schéma 117 : Couplage entre les azotures de sulfonyle (262) et (263) et les acides boroniques (264) et (265) d'après Moon <i>et al.</i> ³³⁴ _____	205
Schéma 118 : Synthèse du monomère Lys-PG (140) _____	213
Schéma 119 : Synthèse du monomère Lys-AX (166) _____	214

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de l'histamine (1) _____	29
Figure 2 : Représentation de la présentation du SMX selon le p-i concept (A) comparé à la présentation selon la théorie de l'haptène (B) par Werner J. Pichler ⁴² _____	31
Figure 3 : Structure chimique de la pénicilline G (7) (A) photographie d'un champignon <i>Penicillium chrysogenum</i> au microscope (www.inspq.qc.ca/compendium-moisissures/penicillium-spp) (B) ____	37
Figure 4 : Représentation de la paroi d'une bactérie à Gram+ (A) comparée à celle d'une bactérie à Gram- (B) ⁹⁶ _____	45
Figure 5 : Déterminants antigéniques mineurs de la pénicilline G (7) _____	46
Figure 6 : Structure chimique de l'acide 6-aminopénicillanique (33) _____	48
Figure 7 : Structure chimique de l'ampicilline (34) et de l'amoxicilline (4) _____	49
Figure 8 : Structure chimique du sulfaméthoxazole (5) _____	55
Figure 9 : Structure chimique du Prontosil (chlorhydrate de sulfamidochrysoïdine) (44) _____	55
Figure 10 : Structure chimique du sulfanilamide (45), métabolite du Prontosil, principe actif contre les bactéries _____	56
Figure 11 : Représentation d'un peptide dans la poche d'ancrage du CMH de classe II. Le N rouge représente la partie N-terminale de la protéine HLA vers laquelle s'oriente le N-terminal du peptide. IMGT/3Dstructure-DB et PDB : 1J8H ¹⁶⁴ _____	69
Figure 12 : Représentation du peptide PKYVKQNTLKLAT dans la poche du HLA-DR1 (HLA-DRA et HLA-DRB1*0101) d'après une publication de Stern. ¹⁷⁴ Vu du dessus (A) et sur le côté (B). La surface de la protéine HLA est représentée en bleu transparent, le peptide est représenté sans ses hydrogènes, les boules jaunes représentent des atomes de carbone, les bleues des atomes d'azote et les rouges des atomes d'oxygène. Les positions de chaque acide aminé du peptide dans la poche HLA sont numérotées (de la position N-terminale à la C-terminale du peptide) avec, en rouge les positions qui orientent les acides aminés vers le HLA, en vert celles qui les orientent vers le TcR et en blanc les acides aminés en zone flanquante _____	70
Figure 13 : Exemple de calculs de RMSD tracés en deux dimensions (RMSD-2D) sur 100 conformations sélectionnées parmi 1 000 produites (A) durant une simulation de dynamique moléculaire de 6,1ns réalisée sur le complexe protéine-ADN (respectivement représentés en blanc et jaune) dans une boîte d'eau TIP3P (B) d'après une publication de Bouard <i>et al.</i> ¹⁹⁷ _____	72
Figure 14 : Western blot des bioconjugués HSA-PG (A) et HSA-AX (B) réalisés à pH 7,4 et 10,6__	87
Figure 15 : Spectre de masse du bioconjugué HSA-PG obtenu à pH physiologique (en rouge) comparé à la HSA commerciale (en noir) et à la HSA traitée dans les conditions de couplage physiologiques (en bleu) _____	88
Figure 16 : Distribution du nombre de molécules de pénicilline G (7) fixées à la HSA après un traitement en conditions physiologiques _____	89

Figure 17 : Spectre de masse d'un des bioconjugués HSA-PG préparé à pH basique (en rouge) comparé à la HSA commerciale (en noir) et à la HSA traitée dans des conditions de couplage basiques (en bleu)	89
Figure 18 : Distribution du nombre de molécules de pénicilline G (7) fixées à la HSA après un traitement en conditions basiques	90
Figure 19 : Spectre de déconvolution de masse de la HSA commerciale	91
Figure 20 : Spectre de masse du bioconjugué HSA-AX préparé à pH physiologique (C) comparé à la HSA commerciale (A) et à la HSA traitée dans des conditions de couplage physiologiques (B)	92
Figure 21 : Spectre de masse du bioconjugué HSA-AX préparé à pH basique (C) comparé à la HSA commerciale (A) et à la HSA traitée dans des conditions de couplage basiques (B)	93
Figure 22 : Spectre MS/MS du décapeptide 11-20 de la HSA, hapténisé par une molécule de pénicilline G (7)	97
Figure 23 : Spectre MS/MS du peptide 539-545 de la HSA, hapténisé par une molécule d'amoxicilline (4) (A) et allure du chromatogramme nano-LC-MS du bioconjugué HSA-AX digéré par la trypsine, entre 22,8 et 24,6 min, les deux pics ayant pour ion parent m/z 591,7947 (B)	100
Figure 24 : Spectres de masse MALDI-ToF du bioconjugué HSA-AX réalisé à pH basique sans traitement (C), comparé aux mêmes bioconjugués laissés dans une solution aqueuse à -20°C pendant 1 mois (D et E), avec pour référence les blancs HSA réalisés dans des conditions de couplage physiologiques (A) et basiques (B)	102
Figure 25 : Position des 4 peptides présélectionnés pour la lysine 212, pour les 7 allèles les plus représentés dans la population caucasienne, en fonction du « core » donné par la méthode NN-align et celle de Sturniolo pour l'allèle 1301. La lysine 212 est représentée en gras, italique et soulignée. Les colonnes vertes représentent les positions de la poche dirigées vers le TcR tandis que les rouges représentent celles dirigées vers le HLA. A droite sont résumés les bons peptides ou non avec les positions 5 surlignées en jaune et les zones flanquantes un - bleu	106
Figure 26 : Observation du centre épimérisé du produit ouvert protégé en ester de TMSE (126) par RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) sur le signal à 5,54 ppm (A) comparé au signal obtenu quand le composé (126) est énantiomériquement pur (B)	127
Figure 27 : Représentation du diastéréoisomère majoritaire du produit (126), isolé et caractérisé du mélange épimérisé	128
Figure 28 : Chromatogrammes UV à 265 nm et TIC des bruts réactionnels des synthèses présentées aux Entrées 3 (A) et 11 (B) du Tableau 24	152
Figure 29 : Structure chimique hypothétique du produit secondaire di-Fmoc (165)	153
Figure 30 : Western blot du bioconjugué HSA-SMX révélé au rouge de ponceau (9 μg de bioconjugué HSA-SMX ont été déposés et 30 μg pour l'échantillon HSA de référence)	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Prévalence allergique des trois médicaments étudiés ainsi que leur classement d'après l'étude réalisée par Bigby et ses collaborateurs en 1986, ⁶⁹ corrélées à leur consommation française (d'après un rapport de novembre 2014 de l'ANSM ⁷¹ en dose définie journalière (DDJ)/1 000 habitants/jour) _____	35
Tableau 2 : logP de l'amoxicilline (4), l'ampicilline (34) et de la pénicilline G (7) _____	54
Tableau 3 : Récapitulatif des sites identifiés comme étant hapténisés par les β -lactames après différentes études réalisées sur la HSA _____	65
Tableau 4 : Fréquences en % des allèles les plus représentés dans la population caucasienne en fonction de l'étude et moyennes des fréquences pondérées par l'effectif de chaque étude (source http://www.allelefreqencies.net ¹⁷¹ consulté en mars 2015) _____	68
Tableau 5 : Différentes séquences de la HSA contenant EK ou FK et leur [M+H] ⁺ respectif _____	96
Tableau 6 : Récapitulatif des sites trouvés comme étant hapténisés par la pénicilline G (7) sur nos bioconjugués en comparaison avec ceux de la littérature. Sont présentés en gras les sites retrouvés en commun entre les quatre études et notre travail _____	98
Tableau 7 : Récapitulatif des sites trouvés comme étant hapténisés par l'amoxicilline (4) sur le bioconjugué HSA-AX à pH 7,4, comparé à l'étude d'Ariza. Sont indiqués en gras les sites retrouvés en commun entre les deux études _____	99
Tableau 8 : Récapitulatif des sites hapténisés sélectionnés pour cette étude pour la pénicilline G (7) et l'amoxicilline (4). Sont représentées en gras les lysines sélectionnées pour l'étude sur l'amoxicilline (4) non retrouvées dans l'étude d'Ariza mais présentes dans celle de Meng <i>et al.</i> ¹⁰³ _____	103
Tableau 9 : Probabilité d'accroche des 15 peptides de 15-mers autour de la lysine 212 (marquée d'une *) pour les 7 allèles HLA-DRB1 les plus représentés dans la population caucasienne. Les minima, pour chaque allèle, sont représentés en couleurs dégradées par ordre croissant (rouge-orange-jaune-rose-violet), et bleu pour les moyennes et médianes _____	105
Tableau 10 : Récapitulatif des peptides sélectionnés pour les 12 lysines d'intérêt _____	107
Tableau 11 : Pourcentage de similarité entre le HLA-DRB1*0101 (1SEB) et les séquences des protéines téléchargées sur la base de données IMGT avec le nom complet de l'allèle utilisé _____	108
Tableau 12 : $\Delta\Delta G_{bind}$ (en kcal/mol) obtenus pour les 9 peptides sélectionnés en fonction de chaque allèle de HLA-DRB1. Sont représentées en vert les valeurs inférieures à -1 kcal/mol, en orange celles comprises entre -1 et 0 kcal/mol, et en rouge celles supérieures à 0 kcal/mol _____	110
Tableau 13 : Résultats de modélisation obtenus pour 9 peptides sur 6 allèles de HLA-DRB1. Pour $\Delta\Delta G_{bind}$: sont représentées en vert les valeurs inférieures à -1 kcal/mol, en orange celles comprises entre -1 et 0 kcal/mol, et en rouge celles supérieures à 0 kcal/mol. Pour les percentiles IEDB : sont représentées en vert les valeurs inférieures à 15, en orange celles comprises entre 15 et 31 et en rouge celles supérieures à 31. Pour les positions : le 1 signifie que la lysine est placée en direction du TcR, et plus particulièrement la position 5 si le 1 est en gras et bleu, le 0 signifie qu'elle est dirigée	

vers le HLA, et le - signifie qu'elle est en zone flanquante. Les résultats encadrés en rouge sont ceux non concordants entre les calculs du $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ et de l'IEDB _____	112
Tableau 14 : Tentatives de protection de l'acide carboxylique de la pénicilline G (7) par un groupement <i>tert</i> -butyle _____	116
Tableau 15 : Différents substrats (113) sujets à la déprotection à l'Alcalase-CLEA d'après Nuijens <i>et al.</i> ²⁴³ _____	121
Tableau 16 : Différentes conditions testées en vue de l'optimisation de l'ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline G protégée en ester de PMB (100) par différentes <i>N</i> -Fmoc lysines protégées (101), (102), (122) et (123) _____	125
Tableau 17 : Différentes conditions utilisées pour l'hydrogénéolyse catalytique du produit (131) en (128) _____	130
Tableau 18 : Tentatives de protection de l'amine endocyclique des produits d'ouverture avec les groupements protecteurs acido-labiles Boc et Moz _____	132
Tableau 19 : Différents essais de synthèse de l'amoxicilline protégée par un carbamate de <i>tert</i> -butyle sur sa fonction amine primaire (143) à partir de l'amoxicilline commerciale (4) _____	143
Tableau 20 : Différentes conditions utilisées par Ponnusamy <i>et al.</i> en fonction de l'acide aminé étudié ²⁶² _____	143
Tableau 21 : Tentatives de protection des trois fonctions réactives de l'amoxicilline commerciale (4) en carbamate de <i>tert</i> -butyle, ester et éther de <i>para</i> -méthoxybenzyle (158) en monotope _____	144
Tableau 22 : Essais de protection de l'amine primaire et de l'acide carboxylique de l'amoxicilline commerciale (4) selon le mode opératoire de Hakimelahi <i>et al.</i> ²⁶³ _____	146
Tableau 23 : Optimisation de la protection de l'acide carboxylique de l'amoxicilline <i>N</i> -Boc (143) en ester de <i>para</i> -méthoxybenzyle (160) _____	148
Tableau 24 : Optimisation de l'ouverture du cycle β -lactame de l'amoxicilline protégée (160) par la lysine protégée en ester d'allyle (102) _____	150
Tableau 25 : Optimisation de la protection en ester de <i>para</i> -méthoxybenzyle de l'amoxicilline <i>N</i> -Boc (143) puis son ouverture par la Fmoc-Lys-OAll (102) en monotope _____	151
Tableau 26 : Résultats des tests biologiques effectués sur 12 peptides hapténisés par la pénicilline G sur la lysine numérotée, synthétisés <i>via</i> l'utilisation du monomère Lys-PG (140) (Marie Eliane Azoury, communications personnelles) _____	160
Tableau 27 : Probabilité d'accroche des 15 peptides de 15-mers autour de la cystéine 34 (marquée d'une *) pour les 7 allèles HLA-DRB1 les plus représentés dans la population caucasienne. Les minima, pour chaque allèle, sont représentés en couleurs dégradées par ordre croissant (rouge-orange-jaune-rose-violet), et bleu pour les moyennes et médianes _____	167
Tableau 28 : Compilation des résultats de la modélisation IEDB : les positions de la cystéine 34 et les percentiles, pour chaque allèle et chaque peptide. Pour les positions : le 1 signifie que la cystéine 34 est placée en direction du TcR, et plus particulièrement en position 5 si le 1 est en gras et bleu, le 0 signifie qu'elle est dirigée vers le HLA, et le - signifie qu'elle est en zone flanquante. Pour les	

percentiles : sont représentées en vert les valeurs inférieures à 15, en orange celles comprises entre 15 et 31 et en rouge celles supérieures à 31 _____	168
Tableau 29 : Peptides sélectionnés pour la cystéine 34 avec leurs avantages et leurs inconvénients _____	169
Tableau 30 : Optimisation des conditions de l'estérification de l'acide carboxylique de la cystéine commerciale (177) _____	172
Tableau 31 : Différentes conditions utilisées dans la littérature pour transformer un acide sulfonique en chlorure d'acide _____	181
Tableau 32 : Différentes conditions utilisées dans la littérature pour transformer un thiol en chlorure d'acide _____	185
Tableau 33 : Différentes conditions entreprises pour convertir la fonction thiol du composé (195) en chlorure de sulfonyle (225) _____	187
Tableau 34 : Optimisation de la synthèse de la cystéine benzylaminosulfonyle (229) à partir des cystéines (194) ou (195) _____	189
Tableau 35 : Différentes conditions entreprises pour tenter de synthétiser le composé (231) _____	191
Tableau 36 : Optimisation de la réaction entre le sulfaméthoxazole (5) et le chlorure de mésyle (232) _____	192
Tableau 37 : Conditions explorées pour l'optimisation de la synthèse du sulfonamide (237) _____	194
Tableau 38 : Différents essais de clivage du groupement benzyle du sulfonamide (236) par hydrogénation catalytique _____	196
Tableau 39 : Tentatives de synthèse du chlorure de sulfonyle (257) _____	203
Tableau 40 : Essais de synthèse du sulfonamide (258) _____	204
Tableau 41 : Récapitulatif des résultats de spectrométrie de masse obtenus pour les bioconjugués HSA-PG et HSA-AX réalisés dans des conditions de couplage à pH physiologique et à pH basique _____	211
Tableau 42 : Peptides sélectionnés en vue d'être synthétisés _____	212

INTRODUCTION

I. Généralités sur les allergies médicamenteuses

L'allergie médicamenteuse est une réaction immunitaire déclenchée contre un principe actif, usuellement inoffensif. L'académie européenne d'allergologie et d'immunologie clinique définit les allergies comme « des réactions d'hypersensibilité initiées par des mécanismes immunologiques ». ^{1,2} L'hypersensibilité, quant à elle, est définie comme provoquant « des symptômes ou des signes cliniques reproductibles objectivement, initiés par une exposition à un stimulus défini, à une dose tolérée par des sujets normaux ». ³

Les allergies représentent 1/3 des effets indésirables médicamenteux. ⁴ L'incidence des réactions allergiques va de 1,8 à 4,2‰ hospitalisations d'après une revue de Thong et Tan, publiée en 2011, regroupant les différentes études sur l'incidence ou la prévalence allergique publiées entre 1983 et 2008. ² Par définition, l'incidence sur une période ne tient compte que des nouveaux cas détectés à cette période alors que la prévalence prend en compte le total des cas présents, donc ceux incidents plus ceux déjà présents.

L'allergie médicamenteuse ne peut être prédite et pose donc un problème sociétal non négligeable de par la puissance de certaines de ses réactions, pouvant conduire au décès du patient. Les symptômes d'une allergie médicamenteuse peuvent être : des éruptions cutanées et de l'urticaire, des troubles digestifs (vomissements, diarrhées) ou respiratoires (toux, éternuements), des irritations oculaires, ou encore des œdèmes, ⁵ mais les réactions cutanées restent les plus fréquentes. ^{6,7} En cas d'exacerbation de ces symptômes, par exemple par une atteinte des muqueuses (exanthème, urticaire, œdème), ou des troubles du rythme cardiaque, voire par une chute de la pression artérielle menant à un collapsus, le terme de choc anaphylactique est utilisé. ⁸ Selon sa gravité, ce choc peut entraîner la mort du patient par un arrêt circulatoire et/ou respiratoire. Plus rarement, certaines réactions allergiques se manifestent par des syndromes potentiellement mortels, tels que le syndrome de Lyell, celui de Stevens-Johnson ou encore le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse, plus connu sous le nom de DRESS (de l'anglais : drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms). Les syndromes de Lyell et de Stevens-Johnson sont des nécrolyses de l'épiderme. Ils se différencient par leur niveau de gravité : pour Stevens-Johnson moins de 10% de l'épiderme est détaché alors que le Lyell présente plus de 30% de décollement. ⁹ Les symptômes du DRESS commencent par de la fièvre, des malaises, des œdèmes et des éruptions cutanées. Surviennent ensuite une éosinophilie (augmentation du nombre d'éosinophiles dans le sang) et autres anomalies hématologiques, hépatiques et rénales. Le taux de mortalité est d'environ 10% en grande partie à cause de son diagnostic difficile. ¹⁰

En 1963, deux immunologistes anglais, Gell et Coombs, ont classé les hypersensibilités allergiques en quatre grands groupes (I, II, III, et IV) selon la forme d'action et le temps croissant de réponse observés (d'immédiat pour la I jusqu'à 2 à 14 jours pour la IV¹¹).^{12,13} Les types I, II et III sont à médiation humorale, c'est-à-dire liés aux lymphocytes B et donc aux anticorps qu'ils produisent. Seule l'hypersensibilité de type IV est à médiation cellulaire, c'est-à-dire liée aux lymphocytes T spécifiques du médicament.¹⁴ Les types II et III sont plus rares cliniquement. Il est fréquent de rencontrer un mécanisme allergique qui combine deux types d'hypersensibilités (types I et IV par exemple).

1) Les mécanismes de l'allergie médicamenteuse

Le mécanisme de l'allergie à médiation humorale implique les anticorps et plus particulièrement les IgE (pour le type I) et les IgG (pour les types II et III).^{12,13} Toute allergie débute par une première phase dite de sensibilisation lors du premier contact des lymphocytes spécifiques de l'antigène (le médicament dans ce cas) avec ce dernier. Elle est cliniquement muette et c'est lors d'un contact ultérieur avec ce même antigène (la phase d'élicitation) que les symptômes de la réaction allergique apparaissent. Dans le cas des hypersensibilités de type I, II et III, cette première phase correspond à l'activation de lymphocytes T (LT) spécifiques par la molécule et à la synthèse des immunoglobulines E ou G spécifiques par les lymphocytes B (différenciés en plasmocytes), ainsi que la prolifération en lymphocytes T spécifiques mémoires. Les hypersensibilités de type IV sont à médiation cellulaire c'est-à-dire que les anticorps n'interviennent pas dans ce mécanisme.¹⁴⁻¹⁶

Lors de la phase d'initiation, l'organisme va dans un premier lieu détecter un danger et capturer les antigènes responsables par le biais des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques.¹⁷ Ces cellules vont, après leur maturation, migrer vers les ganglions lymphatiques et digérer l'antigène puis faire entrer en action les lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Ces lymphocytes sont dits naïfs, c'est-à-dire qu'ils n'ont jamais été en contact avec l'antigène pour lequel ils présentent une spécificité. Ayant digéré l'antigène, la cellule dendritique ne va présenter aux lymphocytes T qu'une partie de l'antigène capable de les activer, appelée épitope. Cette présentation se fait par le biais d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (pour l'Homme le CMH s'appelle le HLA : human leucocyte antigen) tandis que les lymphocytes T spécifiques détectent l'épitope par le biais de leur récepteur (TcR). Une prolifération lymphocytaire a alors lieu, différenciant deux types de lymphocytes : les effecteurs, qui migrent vers les tissus périphériques et les lymphocytes T mémoires qui sont stockés dans les ganglions lymphatiques et au niveau des territoires périphériques et entrent en jeu lors de la phase d'élicitation (Schéma 1).^{18,19}

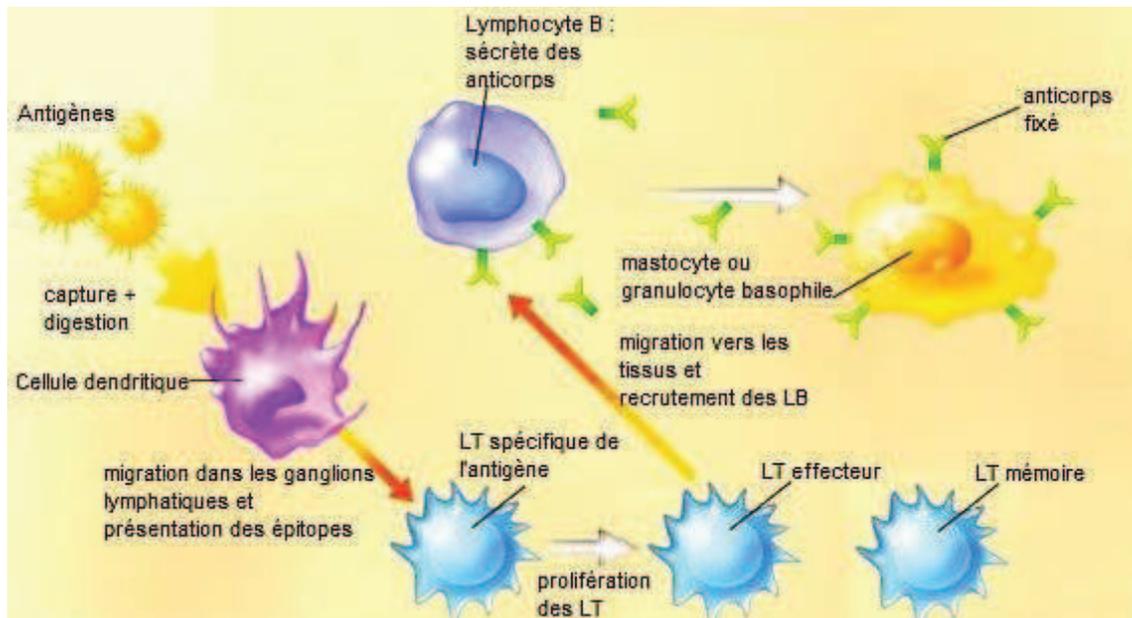


Schéma 1 : Principe général de la phase d'initiation d'une réaction allergique

Lors d'une nouvelle exposition à l'antigène le même mécanisme de capture a lieu mais c'est à un lymphocyte T mémoire (et non plus naïf) que la cellule dendritique présente l'épitope. Ils deviennent alors des lymphocytes T effecteurs et migrent vers les tissus périphériques pour déclencher la réponse immunitaire contre l'antigène qui, elle, sera cliniquement visible de par le nombre plus important de lymphocytes T mémoires par rapport aux lymphocytes T naïfs de la phase d'initiation, et par un déficit en lymphocytes T régulateurs. Pour déclencher la réponse, le lymphocyte T va sécréter des cytokines recrutant des cellules effectrices différentes selon le type d'hypersensibilité.

Dans le cadre de notre étude nous nous intéressons plus particulièrement aux hypersensibilités immédiates (type I). Les IgE spécifiques de l'antibiotique, synthétisés lors du premier contact, sont fixés à la surface des mastocytes et des granulocytes basophiles. Ces deux types de cellules sont des globules blancs présents respectivement dans les tissus et dans le sang. Ils sont non-spécifiques mais dits sensibilisés quand des IgE spécifiques d'un antigène sont fixés à leur surface. Ils ont la capacité de se dégranuler au contact de cet antigène. La dégranulation consiste en la libération des médiateurs chimiques présents dans des poches appelées granules dans le cytoplasme des mastocytes et basophiles. Les médiateurs chimiques libérés sont des amines vasoactives entre autre l'histamine (1) (Figure 1), des enzymes comme la tryptase, des médiateurs lipidiques et différentes cytokines.^{15,16}

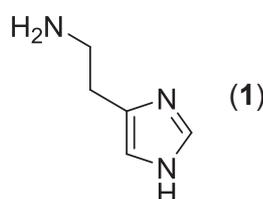


Figure 1 : Structure chimique de l'histamine (1)

L'histamine (1) est en grande partie responsable des signes de l'allergie tels que l'urticaire, les conjonctivites et les rhinites allergiques. Elle se fixe sur des récepteurs de l'histamine, notamment ceux présents sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et ceux des cellules musculaires lisses, ce qui induit respectivement des vasodilatations et des bronchoconstrictions (de même avec les médiateurs lipidiques libérés, tels que les prostaglandines et les leucotriènes). Si elle est libérée en très grande quantité elle va pouvoir induire des baisses de tension et des chocs anaphylactiques.

Les cytokines quant à elles stimulent le recrutement des leucocytes qui sont responsables de la phase plus tardive de la réaction allergique (de 6 à 24h après le deuxième contact avec l'antigène) menant à des lésions tissulaires ainsi qu'une forte sécrétion de mucus dans les voies respiratoires.^{15,16}

Nous allons maintenant nous intéresser aux déclencheurs de ces mécanismes de la réaction allergique : les antigènes. Les antibiotiques ont la particularité d'avoir un faible poids moléculaire, ils ne peuvent donc pas stimuler le système immunitaire par eux-mêmes. La théorie de l'haptène permet de comprendre d'où vient leur caractère antigénique.

2) La théorie de l'haptène

Le concept de l'haptène a été inventé en 1935 par Landsteiner et Jacobs.²⁰ Un haptène est un principe actif (molécule antigénique) ayant un poids moléculaire inférieur à 1 000 Da. Il peut être reconnu par le système immunitaire mais n'est pas capable de provoquer une réponse. Pour être détecté par les cellules dendritiques, il doit être lié à une protéine porteuse, cellulaire ou sérique telle que l'albumine du sérum humain (HSA). On dit que la protéine est hapténisée par le médicament.^{18,20-24}

On parle de pro-haptène, quand le principe actif subit une modification de type enzymatique (métabolisation *in situ* de la molécule antigénique) avant de se lier covalamment à la protéine porteuse. Et on parle de pré-haptène quand la modification subie est non enzymatique (c'est-à-dire chimique).²⁵

Les antigènes immunogènes détectés par les cellules du système immunitaire sont généralement des protéines covalamment modifiées par un principe actif, ou l'un de ses métabolites. Une protéine modifiée pourra donc être captée par une cellule dendritique, qui la digèrera en plusieurs fragments peptidiques. Certains peptides, présenteront le médicament ou un métabolite antigénique. Ils constitueront donc les épitopes hypothétiques. La cellule dendritique va présenter ces peptides – dont des épitopes – *via* les molécules du CMH à un lymphocyte T spécifique de l'antibiotique qui va le reconnaître sur les épitopes grâce à son TcR.²⁶

Ainsi il existe deux classes de CMH (I et II) en fonction du lymphocyte T impliqué :

- lors d'une présentation de l'épitope aux lymphocytes T CD8+ c'est le CMH de classe I qui est sollicité,²⁷
- pour une présentation aux lymphocytes T CD4+ c'est le CMH de classe II.²⁷

Concernant les pénicillines et les sulfamides, les deux familles d'antibiotiques provoquant le plus de réactions allergiques (*cf.* Introduction partie II p.35), des lymphocytes T spécifiques de ces derniers ont été retrouvés dans le sang de patients allergiques, en particulier les CD4+.²⁸⁻³⁴ Entre autre, des études préalables ont été réalisées par nos partenaires, l'équipe du docteur Rozières³⁵ ainsi que l'équipe du professeur Pallardy.³⁶⁻³⁸ Elles mettent en exergue l'implication des lymphocytes T CD4+ dans le mécanisme de l'allergie médicamenteuse. Ce sont donc les molécules du CMH de classe II de la cellule dendritique (chez l'Homme ce sont les HLA-DR, DP ou DQ) qui seront les plus importantes lors de la présentation aux lymphocytes T, et donc celles sur lesquelles nous allons nous pencher.

Cependant, l'équipe de Pichler a postulé la possibilité que certains antibiotiques puissent être présentés directement aux récepteurs des lymphocytes T et induire la réponse immunitaire selon un mécanisme appelé le p-i concept (pharmacologic interaction with immune receptors). Ce concept consiste en la présentation directe du médicament aux lymphocytes T sans passer par la phase d'hapténisation d'une protéine puis de digestion par la cellule dendritique. La molécule vient se placer, *via* des liaisons non-covalentes, entre le TcR et un HLA d'une cellule dendritique présentant un peptide non hapténisé à un lymphocyte T. Elle est donc captée par un lymphocyte T spécifique et déclenche son activation. Ce mécanisme a en particulier été illustré avec un antibiotique de la famille des sulfamides : le sulfaméthoxazole (SMX), que nous définirons dans la partie suivante (*cf.* Introduction partie II 3) p.55) (Figure 2).^{21,39-42}

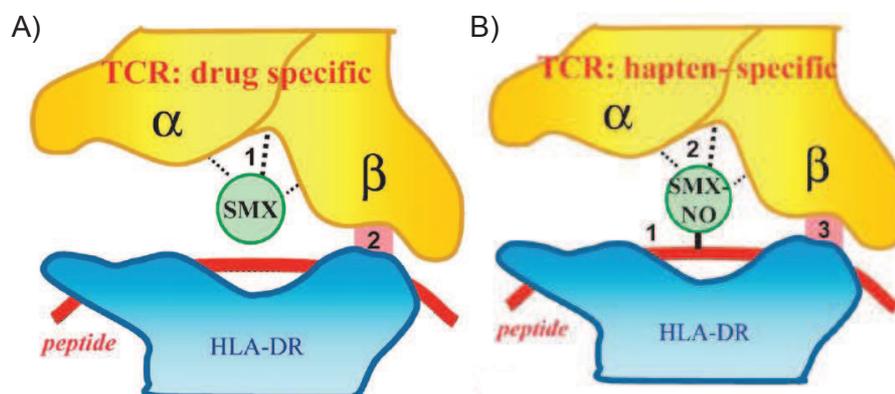


Figure 2 : Représentation de la présentation du SMX selon le p-i concept (A) comparé à la présentation selon la théorie de l'haptène (B) par Werner J. Pichler⁴²

3) Le diagnostic d'une réaction allergique

Mis à part les symptômes très graves, la plupart des autres symptômes des réactions allergiques médicamenteuses sont souvent confondus avec les effets secondaires possibles des médicaments concernés ce qui rend le diagnostic d'une allergie difficile. Les symptômes les plus repérables sont ceux de type cutané qui peuvent être confirmés par un dermatologue.

En cas de réaction allergique soupçonnée, le patient va dans un premier temps subir un interrogatoire médical sur les types de symptômes ressentis.^{5,43} En cas de validation d'une réaction allergique par un médecin généraliste, le patient va être orienté vers un allergologue pour effectuer des tests cutanés et/ou biologiques. Les tests cutanés sont des prick-tests et des tests intradermiques. Ils sont mis en œuvre dans le cas d'hypersensibilités immédiates (donc médiées par des IgE). Les prick-tests consistent à déposer une goutte d'allergène dilué sur la peau de l'avant-bras ou du dos du patient, puis à faire pénétrer cette goutte dans l'épiderme par le biais d'une aiguille. L'apparition d'une éruption cutanée valide l'allergie au médicament testé mais la réciproque n'est pas vraie. Les tests intradermiques consistent en l'injection de l'allergène sous la peau. Si le diamètre de la papule alors formée augmente, selon certains critères, alors le test est positif. Ici encore, un test négatif ne réfute pas la possibilité d'allergie. Ces tests doivent cependant être réalisés dans un établissement spécialisé car ils peuvent donner lieu à un choc anaphylactique chez certains patients.⁴⁴⁻⁴⁸

Dans les cas d'hypersensibilités retardées les tests cutanés mis en place sont des tests intradermiques à lecture retardée ou des patchs tests.⁴⁹ Les patchs permettent l'application prolongée du médicament (2 à 3 jours) sur la peau du dos du patient. Lors du retrait par l'allergologue si des réactions sont observées le patient est considéré allergique. Une absence de réaction n'est toujours pas une preuve de non allergie.

En dernière intention, quand tous les tests cutanés réalisés se sont avérés négatifs malgré les observations préliminaires d'une potentielle allergie, ou quand les tests cutanés ne sont pas réalisables, un test de provocation peut être réalisé.⁵⁰⁻⁵² Il consiste à administrer l'allergène soupçonné par la même voie que celle ayant provoqué l'hypothétique réaction allergique. Il n'est réalisé que pour des médicaments très utilisés et non remplaçables. Ce test est beaucoup plus sensible que les tests cutanés, il est considéré comme le test « gold standard », donc ayant une sensibilité de 100%.⁵ Mais il est de ce fait dangereux pour le patient et doit être réalisé dans un établissement possédant un service de réanimation.⁵³

Si les symptômes allergiques présumés étaient apparentés à un syndrome de Stevens-Johnson, Lyell ou DRESS, les tests cutanés ne peuvent être mis en œuvre.¹⁰ En complément des tests cutanés, des tests biologiques doivent être effectués.⁵⁴ Ils consistent en la détection d'anticorps spécifiques du médicament (IgE pour le type I). Seulement le résultat ne peut démontrer à lui seul

une allergie. Ces tests sont de faible sensibilité, en particulier dans le cas des pénicillines.^{55,56} Les tests de dégranulation des basophiles ne sont pas fiables (50% de sensibilité)⁵⁷ compte tenu du faible nombre de basophiles circulants.^{56,58} Les tests de libération des sulfidoleucotriènes restent à valider du fait de leur manque de sensibilité et de spécificité.^{59,60} Devant une réaction clinique aiguë, un dosage sanguin d'histamine, de tryptase et des dosages urinaires de méthylhistamine précisent le rôle des basophiles et des mastocytes, quelle que soit la cause de la dégranulation.⁵⁹

Des tests *in vitro* sur des lymphocytes T sont également réalisés puisqu'il existe un grand nombre de lymphocytes T mémoires spécifiques du médicament allergisant dans le sang des patients allergiques ayant déjà été en contact avec l'allergène.⁶¹ Le test de transformation lymphocytaire (TTL) permet de mesurer la prolifération des lymphocytes T spécifiques, en particulier pour les hypersensibilités retardées aux β -lactames.^{28,29,50,62-66} Mais il est également utilisé dans le cas des allergies aux sulfamides.^{31,33,67} Il est très utilisé car inoffensif, et est donc préféré pour les patients qui auraient été victimes de réactions d'hypersensibilités violentes.⁶⁶ Un autre test pour les hypersensibilités retardées aux β -lactames sur les lymphocytes T spécifiques utilise la technique de détection d'interférons- γ *via* l'ELISpot (enzyme-linked immunosorbent spot), mais il n'est pas encore employé couramment et reste dans le domaine de la recherche.³⁵

Les tests diagnostiques sont nombreux mais aucun n'est encore idéal. L'intérêt de développer de nouveaux tests répondant à ces critères de sélectivité, de sensibilité et de facilité d'usage pour le personnel médical est donc suscité à l'heure actuelle.

4) Le traitement des allergies

Il existe de nos jours très peu de traitements efficaces pour soigner les allergies. Le plus utilisé est ce que l'on appelle l'éviction de l'allergène.⁵ Ce n'est pas réellement un traitement car il consiste en fait à éviter tout contact avec l'allergène. Pour le cas des pénicillines l'éviction est plutôt simple puisqu'il existe d'autres antibiotiques qui peuvent remplacer l'action des pénicillines, par exemple un macrolide, une tétracycline ou une quinolone. Les céphalosporines, quant à elles, sont plutôt déconseillées à cause du risque de réactions croisées. Cependant, il est bien connu que les autres antibiotiques sont moins efficaces que les pénicillines, et les β -lactames en général. Ils engendrent des résistances de la part de certaines bactéries, c'est la raison pour laquelle il est fortement conseillé d'effectuer les tests diagnostiques plutôt que de s'auto-déclarer allergique à cause d'une mauvaise interprétation d'un phénomène cutané.

Lorsque le médicament est indispensable et irremplaçable un traitement symptomatique peut être administré avant la prise du médicament. Cependant ce traitement ne va agir que sur les signes ou symptômes de l'allergie et pas sur sa cause. Il existe deux types de traitements symptomatiques : les antihistaminiques et les corticoïdes.

Les antihistaminiques réduisent les effets de l'histamine (1). Ils sont des antagonistes compétitifs des récepteurs de l'histamine de type I (H₁). Il existe également un autre type d'antihistaminique : la tritoqualine (2), qui est un inhibiteur de l'enzyme L-histidine décarboxylase qui permet la synthèse de l'histamine (1) à partir de la L-histidine (3) (Schéma 2).

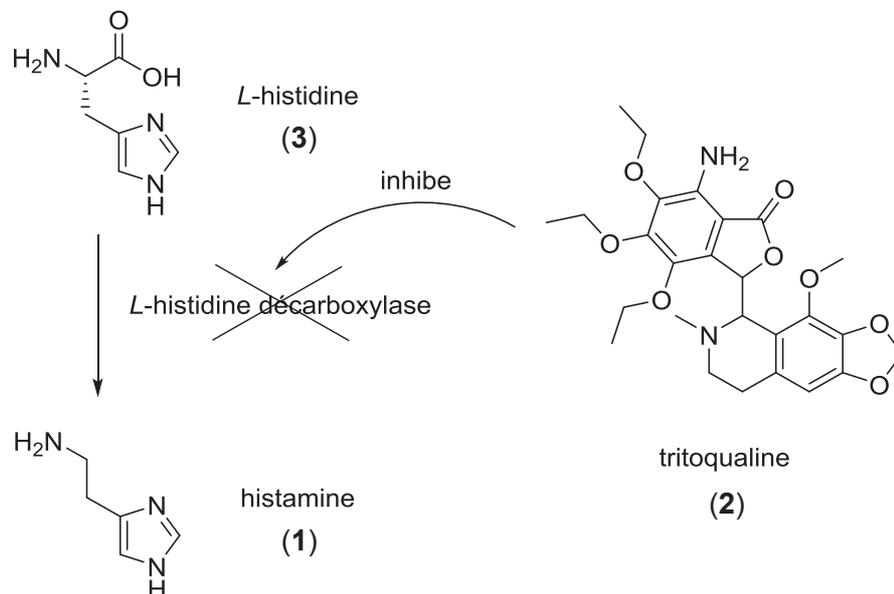


Schéma 2 : Synthèse de l'histamine (1) à partir de la L-histidine (3) et son inhibition par la tritoqualine (2)

Les corticoïdes sont des médicaments anti-inflammatoires, ils sont administrés en cas de réaction allergique violente. Il est conseillé d'administrer des corticoïdes en parallèle des antihistaminiques car ces derniers n'empêchent pas les chocs anaphylactiques et peuvent même en masquer les premiers symptômes. Par contre, les corticoïdes en association avec des antihistaminiques ont pu diminuer l'incidence de certaines réactions allergiques.⁵

La désensibilisation, ou immunothérapie spécifique, agit sur le système immunitaire en induisant une tolérance de l'organisme vis-à-vis de l'allergène responsable des symptômes.⁶⁸ Le traitement consiste en des injections de doses croissantes d'allergène au niveau sous-cutané. Elles doivent être réalisées à intervalles réguliers et peuvent durer plusieurs années. Les traitements ne cessent d'évoluer et deviennent plus simples pour le patient grâce à des traitements sublinguaux. La désensibilisation à la pénicilline est effectuée par voie orale car le risque de réactions graves est amoindri.⁵ La désensibilisation est le seul traitement reconnu par l'OMS comme efficace et durable. Elle offre d'excellents résultats sur le long terme car ce traitement, comme son nom l'indique, désensibilise l'organisme et l'empêche de réagir. À l'heure actuelle, la désensibilisation est le seul traitement curatif de l'allergie. Cependant le risque de réaction grave n'est pas négligeable, une dose même infime de l'allergène peut mettre en jeu la vie du patient. De nouveaux traitements doivent donc être mis en place pour induire une tolérance sans présenter un danger pour le patient.

C'est dans ce contexte que se situe notre travail. Trouver des nouveaux outils moléculaires pour le développement de nouveaux tests diagnostiques et traitements thérapeutiques de désensibilisation. Notre but est donc d'identifier quels sont les épitopes qui, une fois présentés aux lymphocytes T spécifiques, déclenchent leur prolifération et donc la réaction immunitaire. Pour ce faire nous allons tout d'abord nous pencher sur la nature de l'antigène faisant l'objet de notre étude.

II. Antibiotiques étudiés responsables d'allergies

Les antibiotiques étudiés ont été choisis par rapport à leur forte prévalence allergique d'après le classement effectué par Bigby et ses collaborateurs en 1986, dans le cadre du Boston Collaborative Drug Surveillance Programme, une étude sur 15 438 patients hospitalisés entre 1975 et 1982.⁶⁹ Ce classement est toujours d'actualité si l'on se réfère à la revue de Thong et Tan publiée en 2011 réunissant plusieurs autres études sur la prévalence et l'incidence des hypersensibilités allergiques médicamenteuses, ainsi que la publication de Doña et ses collaborateurs de 2012 relatant d'une étude réalisée entre 2005 et 2010.^{2,70}

Lors de l'étude menée par Bigby *et al.*, chaque réaction cutanée d'origine allergique est validée par un dermatologue et comptabilisée afin de calculer la prévalence de chaque médicament.⁶⁹ Au total la prévalence allergique globale observée pour les antibiotiques est de 2,2%. Elle a ensuite été calculée pour chaque médicament. Il en ressort que les deux médicaments ayant la plus forte prévalence allergique sont l'amoxicilline (4) et le sulfaméthoxazole (5) (Tableau 1).⁶⁹

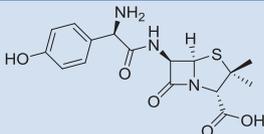
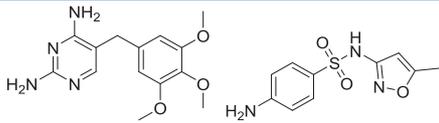
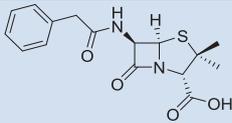
Médicament	Structure	Prévalence (%)	Classement	Consommation française (DDJ/ 1 000 hab/j) ⁷¹
Amoxicilline (4)		5,1	1	10,7
Triméthoprim (6) -sulfaméthoxazole (5)		3,4	2	0,3
Pénicilline G (7)		1,9	10	0,4

Tableau 1 : Prévalence allergique des trois médicaments étudiés ainsi que leur classement d'après l'étude réalisée par Bigby et ses collaborateurs en 1986,⁶⁹ corrélées à leur consommation française (d'après un rapport de novembre 2014 de l'ANSM⁷¹ en dose définie journalière (DDJ)/1 000 habitants/jour)

D'après le Tableau 1, l'antibiotique qui suscite le plus grand nombre de réactions allergiques cutanées est l'amoxicilline (4) avec une prévalence de 5,1%, soit 63 patients allergiques sur 1 225.⁶⁹ Etant l'antibiotique de première intention, sa consommation en France est également la plus élevée des antibiotiques avec 10,7 doses définies journalières (DDJ)/1 000 habitants/jour. D'après le « Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology » de l'OMS la DDJ permet de calculer à partir du nombre d'unités vendues, et en fonction du nombre d'habitants, la consommation journalière de chaque molécule.⁷¹ Le mélange des deux antibiotiques triméthoprime (6) – sulfaméthoxazole (5) est la deuxième composition qui provoque le plus d'allergies avec une prévalence de 3,4%, soit 36 cas sur 1 066.⁶⁹ Sa consommation en France est de 0,3 DDJ/1 000 habitants/jour, c'est l'un des antibiotiques les moins utilisés mais il est surtout administré pour la prévention et le traitement d'infections opportunistes chez les patients séropositifs.⁷¹ Au dixième rang, on retrouve la pénicilline G (7) avec une prévalence de 1,9%, soit 17 cas sur 918 patients.⁶⁹ En France cet antibiotique est consommé à raison de 0,4 DDJ/1 000 habitants/jour, c'est une des pénicillines les moins prescrites de nos jours étant moins efficace que l'amoxicilline (4) sur un grand nombre de souches bactériennes.⁷¹

Les antibiotiques sur lesquels notre étude s'est portée sont donc les antibiotiques de type pénicillines et sulfamides au vu de leurs fortes prévalences allergiques et de leur importance au niveau clinique. Pour généraliser l'étude sur les pénicillines, nous avons choisi de travailler en premier lieu sur un β -lactame modèle : la pénicilline G (7), qui a une structure plus lipophile que l'amoxicilline (4). Bien qu'elle soit moins utilisée cliniquement ayant un spectre d'action moins étendu, elle est tout de même classée au 10^e rang des prévalences allergiques (1,9%) d'après l'étude de Bigby et ses collaborateurs (Tableau 1).⁶⁹

Après l'étude sur la pénicilline G (7), celle sur l'amoxicilline (4) sera entreprise, et en dernier lieu, cette étude s'intéressera à une autre grande famille d'allergènes, les sulfamides avec le sulfaméthoxazole (5).

1) Pénicilline G

La pénicilline G (PG) (7), ou benzylpénicilline, d'origine naturelle est produite par les champignons du genre *Penicillium* (Figure 3).

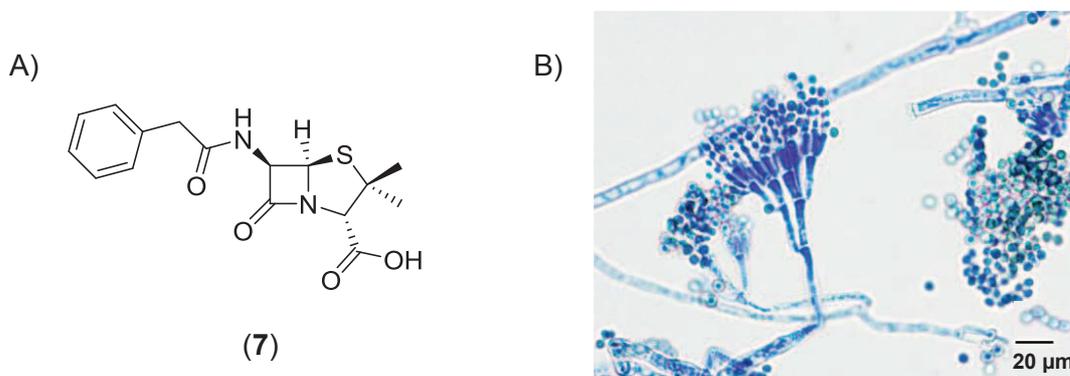


Figure 3 : Structure chimique de la pénicilline G (7) (A) photographie d'un champignon *Penicillium chrysogenum* au microscope (www.inspq.qc.ca/compendium-moisissures/penicillium-spp) (B)

a) L'histoire de la pénicilline

Depuis l'antiquité, certaines populations utilisent les champignons et moisissures pour traiter des blessures et infections. Depuis les années 1870, les scientifiques, dont Louis Pasteur, se sont intéressés au développement ou non de bactéries en présence de moisissures.

En 1897, le docteur Ernest Duchesne soutient sa thèse intitulée « Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes : antagonisme entre les microbes et les moisissures ». ⁷² Il étudie l'interaction entre un champignon qu'il désigne comme étant le *Penicillium glaucum* (mais compte tenu de la nomenclature de l'époque, il se peut que son étude ait porté sur un autre type de *Penicillium*) et les bactéries *Escherichia coli*. Bien que les résultats soient peu concluants, il reconnaît que son étude, peu poussée, requiert d'être plus approfondie et peut conduire à « la découverte d'autres faits directement utiles et applicables à l'hygiène prophylactique et à la thérapeutique ». ⁷²

La pénicilline G (7) a, quant à elle, été accidentellement découverte en 1928 par le docteur Alexander Fleming qui, en rentrant de vacances à son laboratoire du Saint-Mary's Hospital de Londres, remarque qu'un champignon, le *Penicillium notatum*, utilisé par son voisin de paillasse, a envahi ses boîtes de Pétri dans lesquelles il effectuait des cultures de staphylocoques. Il constate alors que là où le champignon s'est implanté, aucun staphylocoque n'a poussé. Il émet alors l'hypothèse que le champignon synthétiserait une molécule aux activités antimicrobiennes qu'il concentre à l'aide d'un chimiste et qu'il nomme « pénicilline ». Après une étude d'un an sur les effets antimicrobiens, la stabilité et la toxicité de la pénicilline, il publie sa découverte mais la pénicilline ne sera pas utilisée en médecine avant les années 1940. ⁷³

Howard Florey, professeur de pathologie à Oxford, Ernst Chain, biochimiste, Norman Heatley, bactériologiste et le chimiste Edward Abraham produisent et purifient pour la première fois la pénicilline. Ils démontrent dans une publication l'effet bactériostatique de la pénicilline et soignent des infections chez les souris, les rats et les chats. ⁷⁴

L'avancée des travaux se heurte alors à la seconde guerre mondiale, Florey, Chain et leur équipe continuent malgré tout et mettent au point une utilisation thérapeutique chez l'Homme et étudient plus précisément la pharmacocinétique de la pénicilline. ⁷⁵ Ils parviennent à guérir un

adolescent de 15 ans présentant une suppuration du col du fémur, ainsi que d'autres patients, adultes et enfants, présentant des infections aux yeux qui n'étaient pas guérissables par les autres traitements essayés ; ils publient alors leurs avancées en 1941.⁷⁵ Cependant la production en grande quantité de la pénicilline doit attendre 1942, aux Etats-Unis, où un autre champignon, le *Penicillium chrysogenum* fut montré comme produisant 200 fois plus de pénicilline que le *Penicillium notatum*. Les laboratoires américains tels que Merck, Pfizer et Squibb se lancent alors dans la production à échelle industrielle et la vente de pénicilline comme médicament appartenant à une nouvelle famille créée à cette époque : les antibiotiques.

Finalement en 1945, Fleming, Florey et Chain se voient récompensés par le prix Nobel de physiologie-médecine pour « la découverte de la pénicilline et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses ».⁷⁶

b) La production de la pénicilline

Les synthèses de la pénicilline G (7) et d'autres pénicillines naturelles ont été entreprises dans les années 50. Cependant, l'étape butoir réside dans la fermeture du cycle β -lactame à 4 unités, très tendu, qui conduit préférentiellement à la création d'un cycle oxazolone (9) à 5 unités plus stable, observé déjà en 1953 par Sheehan et ses collaborateurs lors de nombreuses tentatives de fermeture en ester de méthyle de pénicilline G (10) (avec du chlorure de thionyle, ou du trichlorure de phosphore, ou du chlorure d'acétyle ou encore de l'anhydride acétique) (Schéma 3).⁷⁷

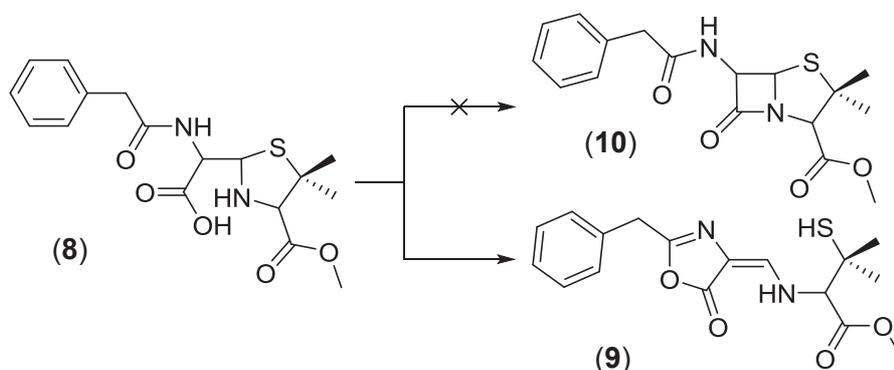


Schéma 3 : Tentatives de fermeture du cycle β -lactame par Sheehan et ses collaborateurs⁷⁷

Ils trouvent alors le moyen de cycliser mais pas directement à partir du dérivé acide de β -méthyl benzylpénicilloate (8). L'ajout d'un dérivé phthalimide au niveau de la chaîne latérale de la pénicilline (11) empêche la formation du cycle oxazolone. Cependant, le rendement de la cyclisation est faible : 13% après l'oxydation du soufre en sulfone (13) par l'action du KMnO_4 dans l'acide acétique sur le dérivé (12) (Schéma 4).⁷⁷

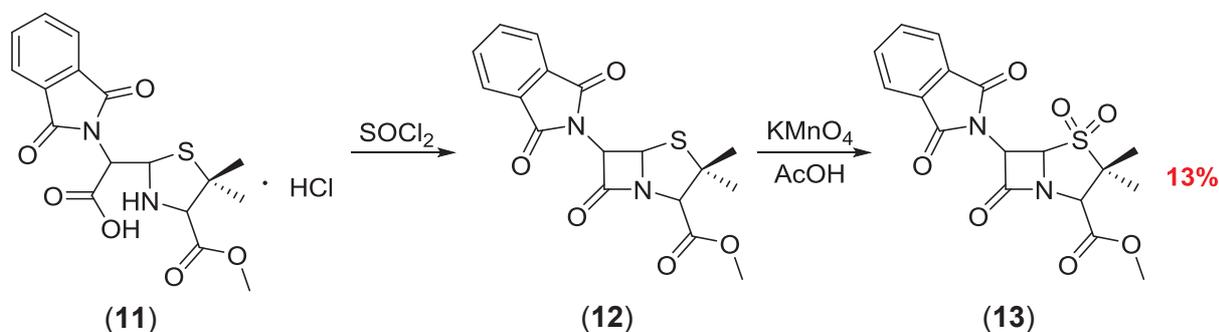


Schéma 4 : Fermeture du β -lactame sur le dérivé phthalimide (11) puis oxydation du soufre en sulfone par Sheehan et ses collaborateurs⁷⁷

Plus tard, en 1955, Sheehan et Hess rapportent l'utilisation de la *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en vue de la formation de liaison peptidique, de type amide, entre un acide carboxylique et une amine.⁷⁸ Sheehan et ses collaborateurs décident alors de tester cette méthode d'amidation pour effectuer la cyclisation du β -lactame sur une pénicilline naturelle. Ils publient alors en 1957 puis en 1959 la synthèse totale d'une pénicilline naturelle : la pénicilline V (14) (Schéma 5).^{79,80} Le phthalimidomalonaldehydrate de *tert*-butyle (15) réagit avec la *D*-pénicillamine (16) en présence d'acétate de sodium aqueux et d'éthanol. Deux centres asymétriques sont alors formés et donc 4 diastéréoisomères peuvent être générés. Deux diastéréoisomères sont observés : (17a) avec 24% de rendement et (17b) avec 30% de rendement. Les auteurs ne sont pas en mesure de connaître la stéréochimie absolue de leurs composés mais après de nombreux tests de comparaison avec les données de la littérature, ils peuvent affirmer que le produit (17a) est celui présentant la même stéréochimie que la pénicilline V naturelle (donc 2*S*,5*R*,6*R*). Le diastéréoisomère (17b) est converti en composé (17a) désiré en effectuant une recristallisation dans la pyridine. 46% De rendement de recristallisation sont obtenus, ce qui équivaut à 14% de rendement en plus pour le composé (17a) et donc un rendement total après recristallisation de 38% en composé désiré. La déprotection du phthalimide est ensuite effectuée avec de l'hydrazine suivie d'un traitement au HCl aqueux qui donne l'amine primaire du dérivé (18) avec un bon rendement de 82%. Sheehan et Hess précisent qu'à partir de ce composé de nombreuses pénicillines peuvent être synthétisées en faisant réagir l'amine primaire avec différents chlorures d'acides. Pour la synthèse de la pénicilline V, c'est le chlorure de phénoxyacyle qui est utilisé à hauteur de 1 équivalent avec 2 équivalents de triéthylamine dans du dichlorométhane. Le composé amidé (19) est obtenu avec un rendement de 70%. Il subit alors la déprotection de son ester de *tert*-butyle en milieu acide. L'acide pénicillanique de la pénicilline V (20) est obtenu quantitativement et subit alors un traitement en milieu basique avec 4 équivalents de DCC pour conduire à la pénicilline V (14) avec un rendement de seulement 5% (Schéma 5).^{79,80}

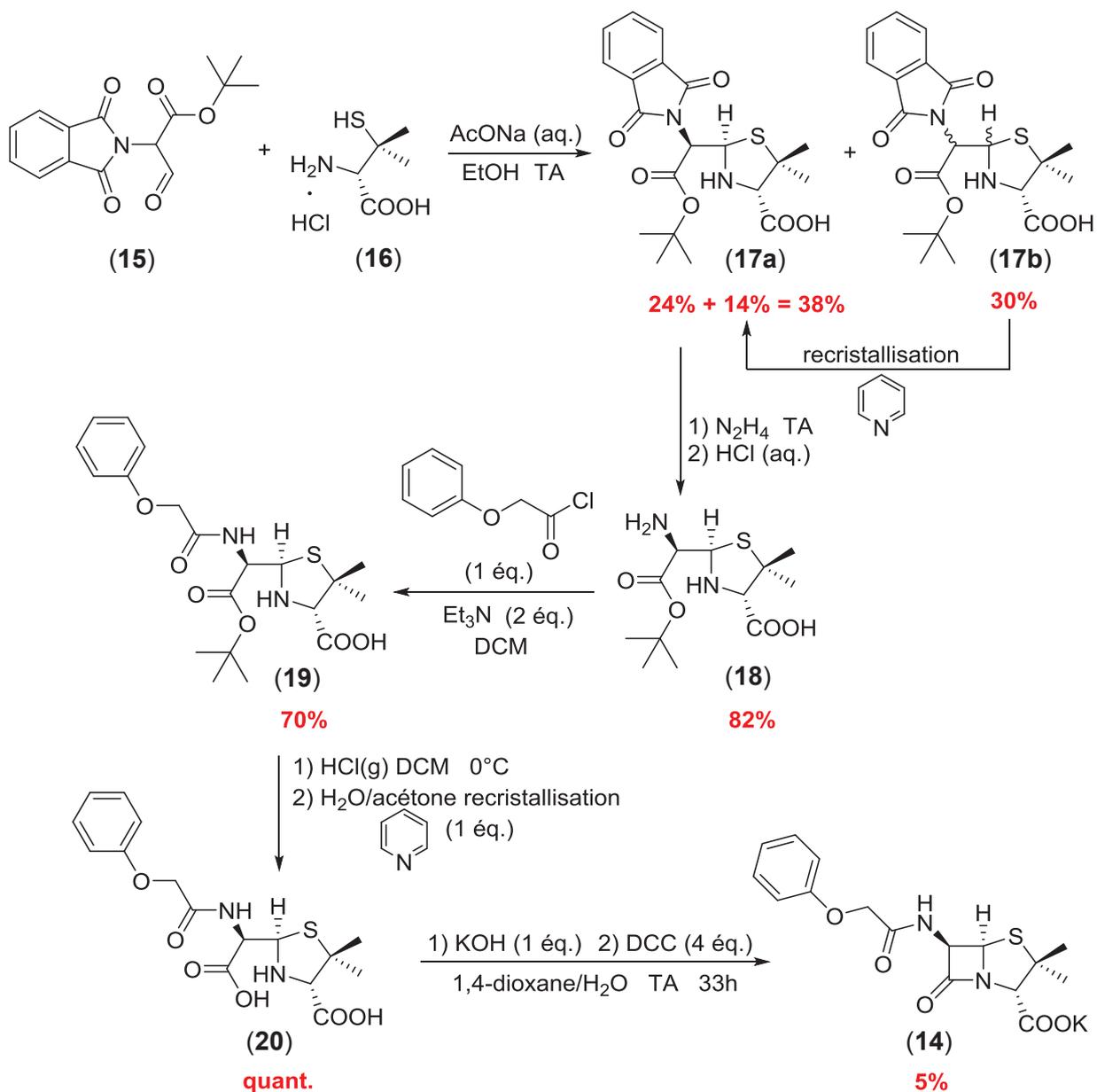


Schéma 5 : Synthèse totale de la pénicilline V (**14**) par Sheehan et ses collaborateurs^{79,80}

En conclusion cette synthèse totale de 5 étapes conduit au produit convoité avec un rendement global de 1%. De plus les auteurs précisent que la synthèse totale a été transposée à la pénicilline G (**7**) mais donne un rendement de cyclisation inférieur à celui de 5% obtenu pour la pénicilline V (**14**).⁸⁰ La recherche sur la synthèse de pénicillines a donc été stoppée d'autant plus que l'amélioration par mutagenèse des souches de champignon productrices de pénicilline et les sélections successives ont abouti à des souches qui produisent plus de 60 000 unités/mL de culture en 200 heures, soit plus de quinze mille fois plus que la souche *Penicillium notatum* de départ.⁸¹ De nombreux brevets ont été déposés sur la production de la pénicilline au fur et à mesure de son amélioration.⁸²⁻⁸⁷ La pénicilline G (**7**) est aujourd'hui encore produite par la voie biotechnologique.⁸⁸

La bioproduction par les champignons consiste en la biosynthèse d'un tripeptide (ACV) de l'acide *L*-aminoadipique (**21**), la *L*-cystéine (**22**) et la *L*-valine (**23**) qui s'épimérise en *D*-valine lors de son incorporation dans l'enzyme *L*-aminoadipyl-*L*-cystéine-*D*-valine synthétase, nommée ACV synthétase. Ce tripeptide (**24**) se cyclise ensuite en isopénicilline N (**25**). Enfin, l'acyltransférase catalyse la substitution de la chaîne latérale par un autre radical (acide phénylacétique pour la pénicilline G (**7**)). Cette acylation biocatalysée autorise l'utilisation de précurseurs différents dans le milieu de culture afin d'augmenter le rendement de la biosynthèse vers un type de pénicilline souhaité (Schéma 6).^{81,89,90}

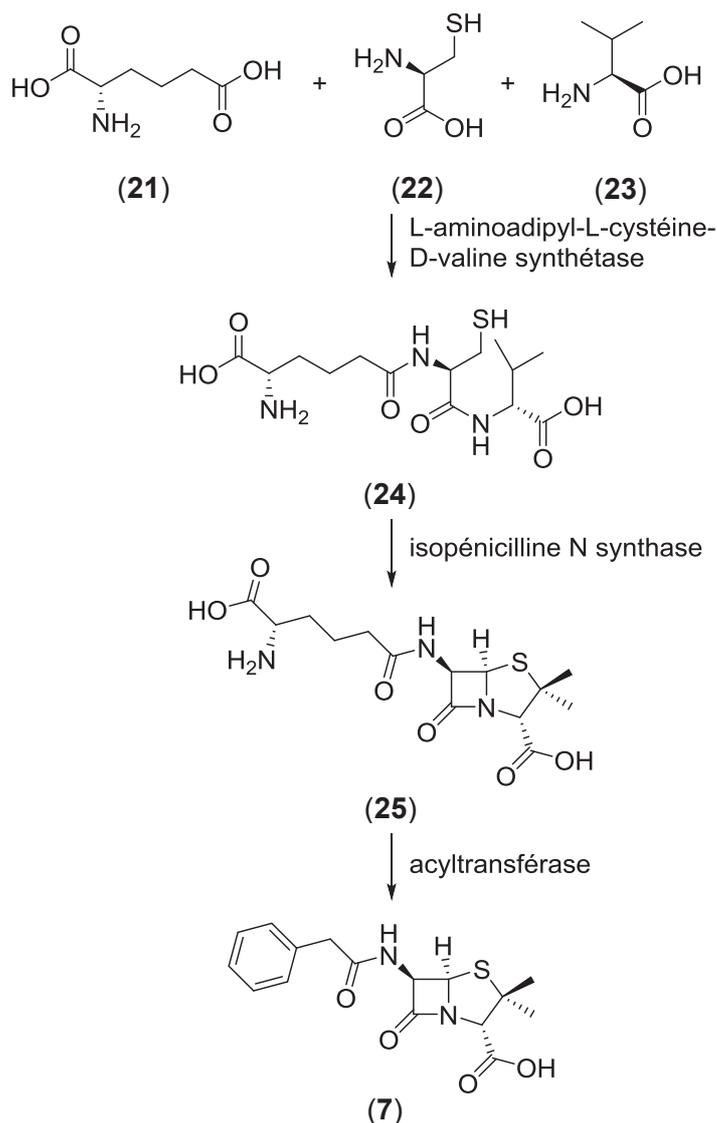


Schéma 6 : Biosynthèse de la pénicilline G (**7**)^{81,90}

La pénicilline est devenue un médicament produit en quantité industrielle alors que sa structure chimique n'était pas encore complètement élucidée et que son mode d'action était totalement inconnu.

c) Le mode d'action des pénicillines

Les pénicillines comme tous les antibiotiques agissent contre les bactéries. La paroi bactérienne est constituée de peptidoglycane qui donne sa forme à la bactérie et lui assure une protection mécanique contre la pression osmotique et les agressions extérieures. Le peptidoglycane est composé d'oligosaccharides, un enchaînement de *N*-acétyl-*D*-glucosamine (NAG) (**26**) et d'acide *N*-acétylmuramique (NAMA) (**27**) liés par des liaisons osidiques $\beta(1\rightarrow4)$ (Schéma 7).

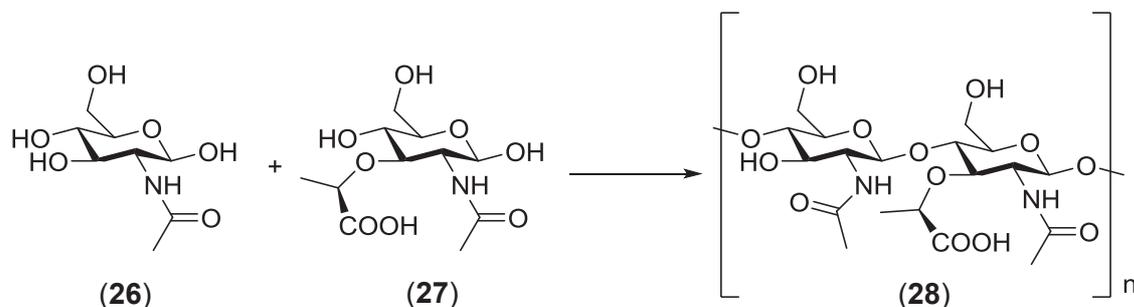


Schéma 7 : Structure chimique de la *N*-acétyl-*D*-glucosamine (**26**) et de l'acide *N*-acétylmuramique (**27**) et leur enchaînement (**28**)

Sur l'extrémité acide carboxylique de certains NAMA (**27**) sont liés des petits peptides composés de *L*-alanine, d'acide *D*-glutamique, de *L*-lysine, de glycine ou d'acide diaminopimélique (analogue de la lysine) et terminés par deux résidus de *D*-alanine. L'assemblage tridimensionnel du peptidoglycane pour former la paroi de la bactérie se fait par le biais d'une enzyme : la transpeptidase. Cette enzyme catalyse la coupure de la liaison amide avec le résidu *D*-alanine terminal et le couplage avec un résidu glycine d'une autre chaîne polypeptidique. Elle assure alors la réticulation du peptidoglycane et la rigidité de la paroi (Schéma 8).⁹¹

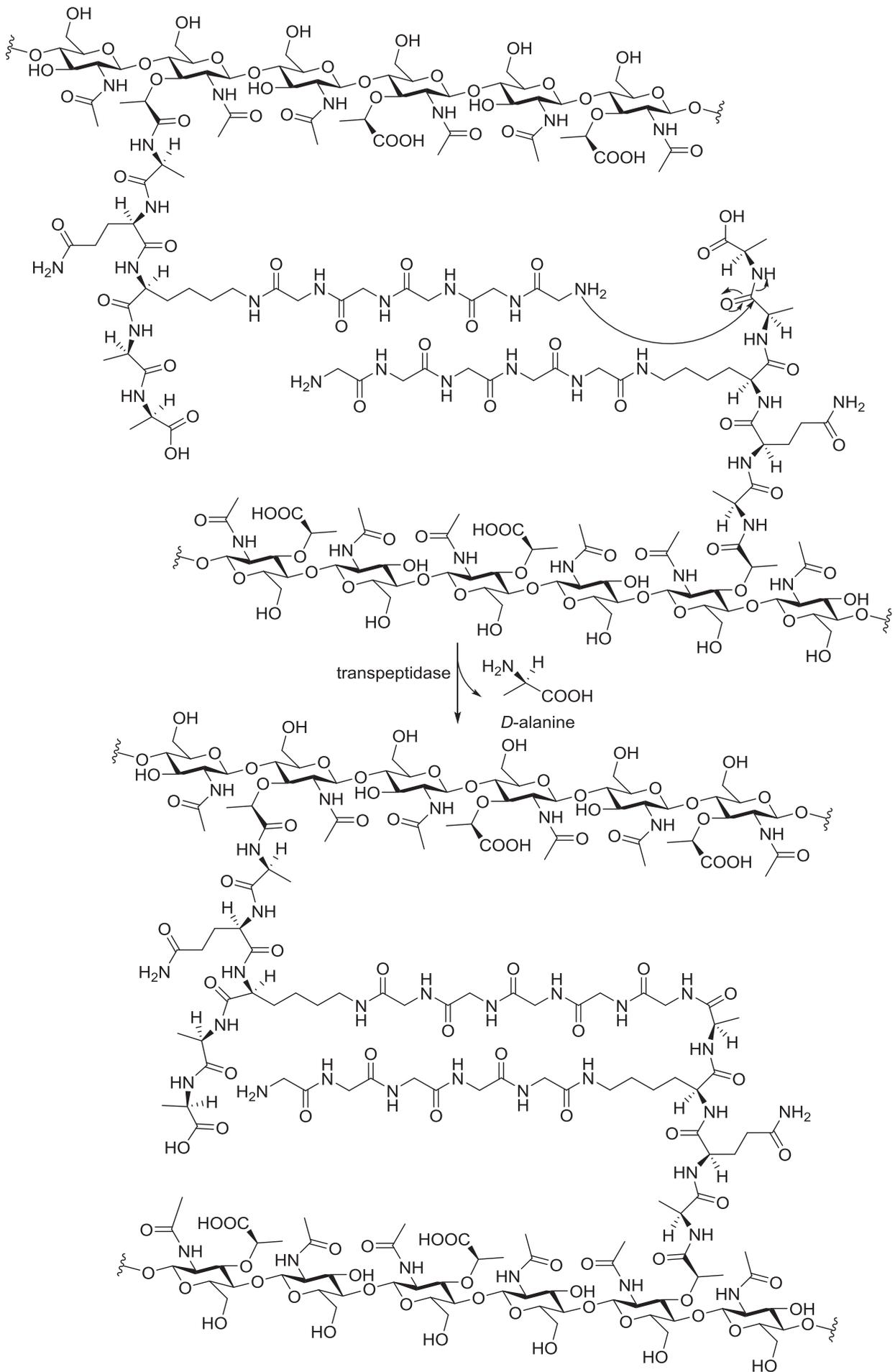


Schéma 8 : Liaison entre deux chaînes de peptidoglycane par l'action de la transpeptidase⁹¹

C'est grâce à l'isostérie entre le dipeptide *D*-alanine-*D*-alanine terminal (**29**) et la pénicilline G (**7**) que cette dernière peut pénétrer le site actif de la transpeptidase et bloquer l'enzyme en se liant à ses résidus sérines *via* l'ouverture de son noyau β -lactame ce qui inhibe la formation de la paroi de la bactérie,⁹¹ et empêche ainsi la division et donc la formation de nouvelles bactéries (Schéma 9).⁹² L'effet bactériostatique des pénicillines n'est donc actif que contre les bactéries en phase de croissance et non celles en phase stationnaire qui ont déjà construit leur peptidoglycane.⁹³ L'effet bactéricide (ce qui va conduire à la destruction des bactéries) résulte en fait dans le mécanisme de la bactérie elle-même qui va – suite à l'altération de son peptidoglycane – activer ses peptidoglycanes-hydrolases, des enzymes également appelées autolysines qui induisent la lyse de la bactérie.^{94,95}

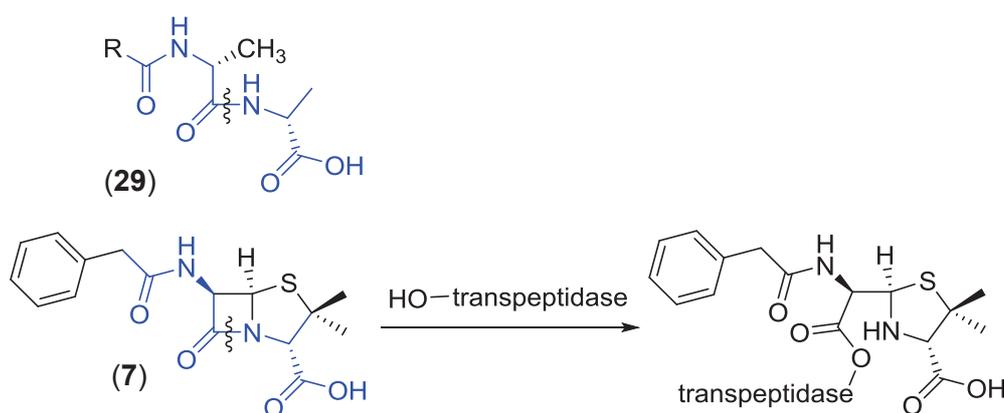


Schéma 9 : Isostérie entre la *D*-alanine-*D*-alanine (29) et la pénicilline G (7), suivi de son ouverture par les résidus sérines de la transpeptidase conduisant à l'inhibition de l'enzyme

L'épaisseur de la paroi est nettement supérieure chez les bactéries dites à Gram+ et est en contact direct avec le milieu extracellulaire. Par contre les bactéries à Gram- ont leur peptidoglycane plus fin et enchâssé entre deux membranes plasmiques dont l'interne est majoritairement phospholipidique tandis que l'externe est majoritairement lipopolysaccharidique, ce qui rend l'accès aux antibiotiques naturels de type β -lactame moins efficace (Figure 4).⁹³ Par contre les bactéries à Gram- présentent des porines au sein de leur membrane externe. Les porines sont des protéines en forme de canaux, qui permettent le passage de petites molécules hydrophiles à travers la membrane externe des bactéries, et permettront donc aux pénicillines d'accéder au peptidoglycane et à la transpeptidase. La faible action de la pénicilline G (**7**) contre les bactéries à Gram- s'explique donc par son caractère peu hydrophile qui défavorise le passage de la membrane externe par les porines. Elle peut tout de même pénétrer dans certaines bactéries Gram- en diffusant à travers la membrane externe, mais ce processus est lent. Après l'action de la pénicilline les bactéries à Gram+ perdent leur membrane cellulaire et sont appelées des protoplastes. Les bactéries à Gram- ne peuvent pas complètement perdre leur membrane cellulaire elles sont donc appelées des sphéroplastes.

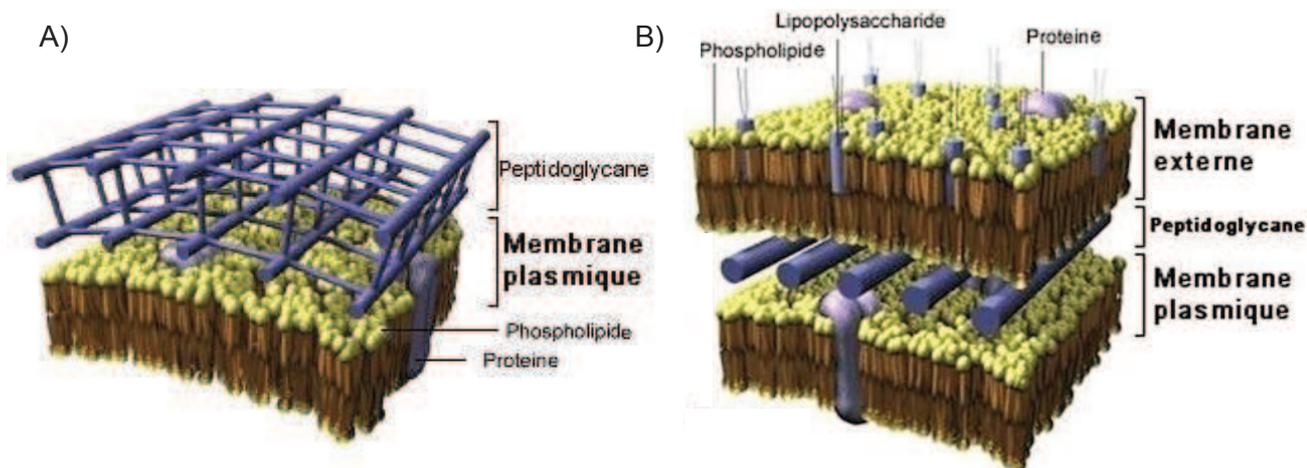


Figure 4 : Représentation de la paroi d'une bactérie à Gram+ (A) comparée à celle d'une bactérie à Gram- (B)⁹⁶

d) Le mode d'hapténisation

La pénicilline G (7), ayant un poids moléculaire de 334,39 g/mol, doit se lier à une protéine pour être détectée par le système immunitaire et déclencher une réaction allergique.²⁶ La pénicilline G (7) est un haptène, les groupements nucléophiles des protéines et plus particulièrement des résidus lysines se lient à la pénicilline via l'ouverture du noyau β -lactame (Schéma 10).^{20,28,97-103}

Comparé à un β -lactame libre, le β -lactame bicyclique des pénicillines a une réactivité exacerbée. En effet, dans ce système bicyclique, une tension de cycle règne en jonction de cycle empêchant l'atome d'azote d'adopter une géométrie plane nuisant à la délocalisation électronique de l'amide. En l'absence de cette délocalisation, la double liaison C=O de la fonction lactame d'une pénicilline est beaucoup plus électrophile que celle d'un β -lactame libre ce qui rend aisée l'attaque par des résidus nucléophiles d'amino-acides, comme par exemple une fonction amine de lysine. L'ouverture du motif β -lactame par un résidu nucléophile d'une protéine engendre la formation d'un bioconjugué (Schéma 10).

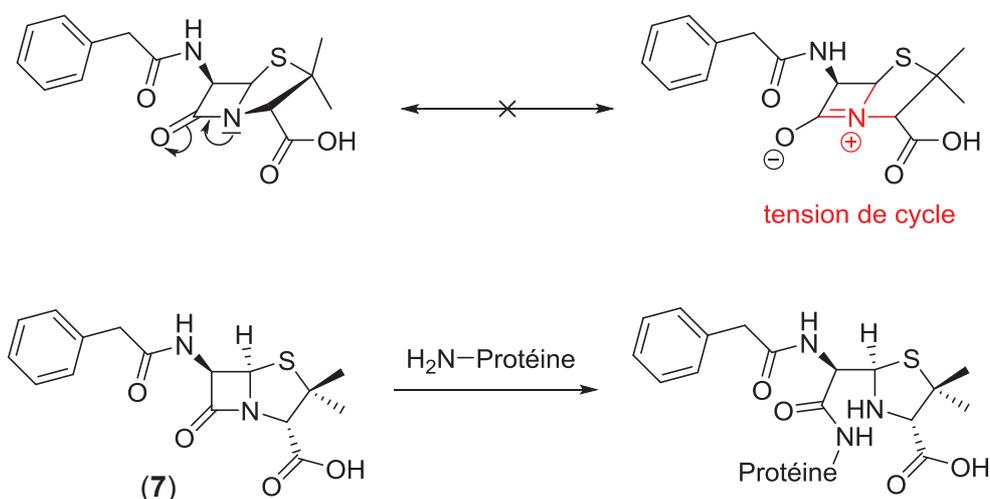


Schéma 10 : Hapténisation de la pénicilline G (7) par ouverture du β -lactame par les acides aminés amino-terminaux d'une protéine

Le motif ouvert pénicilloyle substituant la protéine constitue alors le déterminant antigénique majeur de la pénicilline G.⁹⁷ D'autres déterminants antigéniques mineurs ont déjà été décrits dans la littérature comme par exemple l'acide benzylpénicillénique-protéine ou la pénicillamine-protéine issus de la réaction des cystéines des protéines (même celles impliquées dans un pont disulfure) avec la pénicilline G (7) (Figure 5).^{97,104,105} Mais ils n'ont jamais été observés *in vitro* au départ de protéines humaines ou de séra de patient.¹⁰³

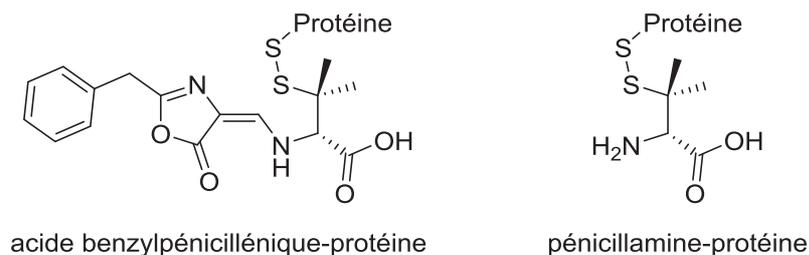


Figure 5 : Déterminants antigéniques mineurs de la pénicilline G (7)

Ces adduits sont issus de la métabolisation de la pénicilline G (7). En milieu aqueux acide (comme dans l'estomac), cette dernière est métabolisée en acide pénicillénique (30) (selon le mécanisme présenté en Schéma 11), ainsi qu'en acide pénicilloïque (31). L'acide pénicillénique (30) se réarrange ensuite rapidement en acide pénillique (32).¹⁰⁶ Et l'acide pénicilloïque (31) se décompose en pénicillamine (16) (Schéma 12).^{97,105}

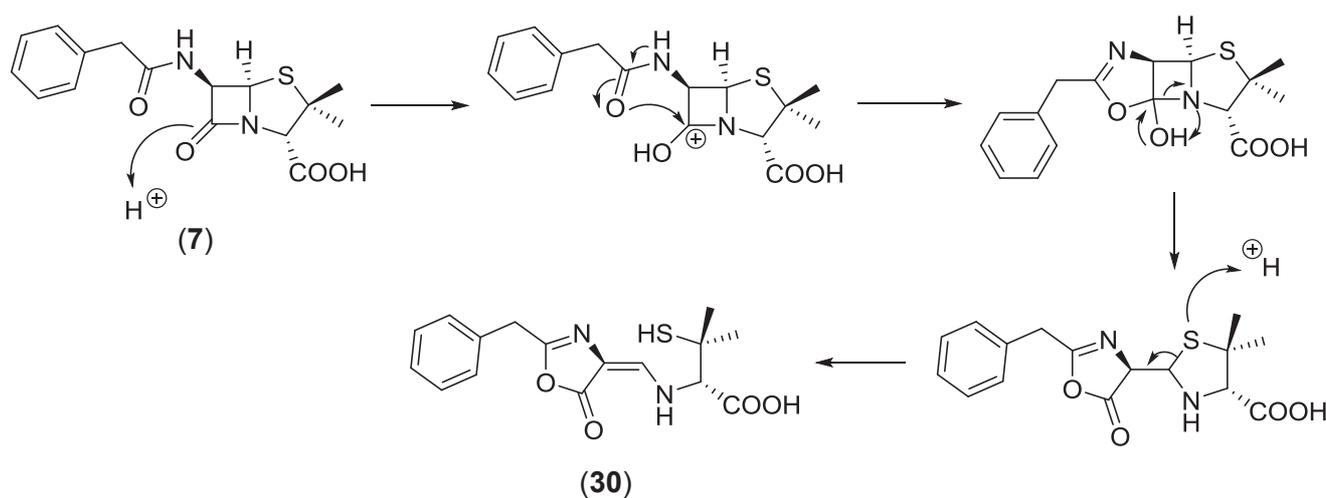


Schéma 11 : Mécanisme de formation de l'acide pénicillénique (30) à partir de la pénicilline G (7), en milieu acide

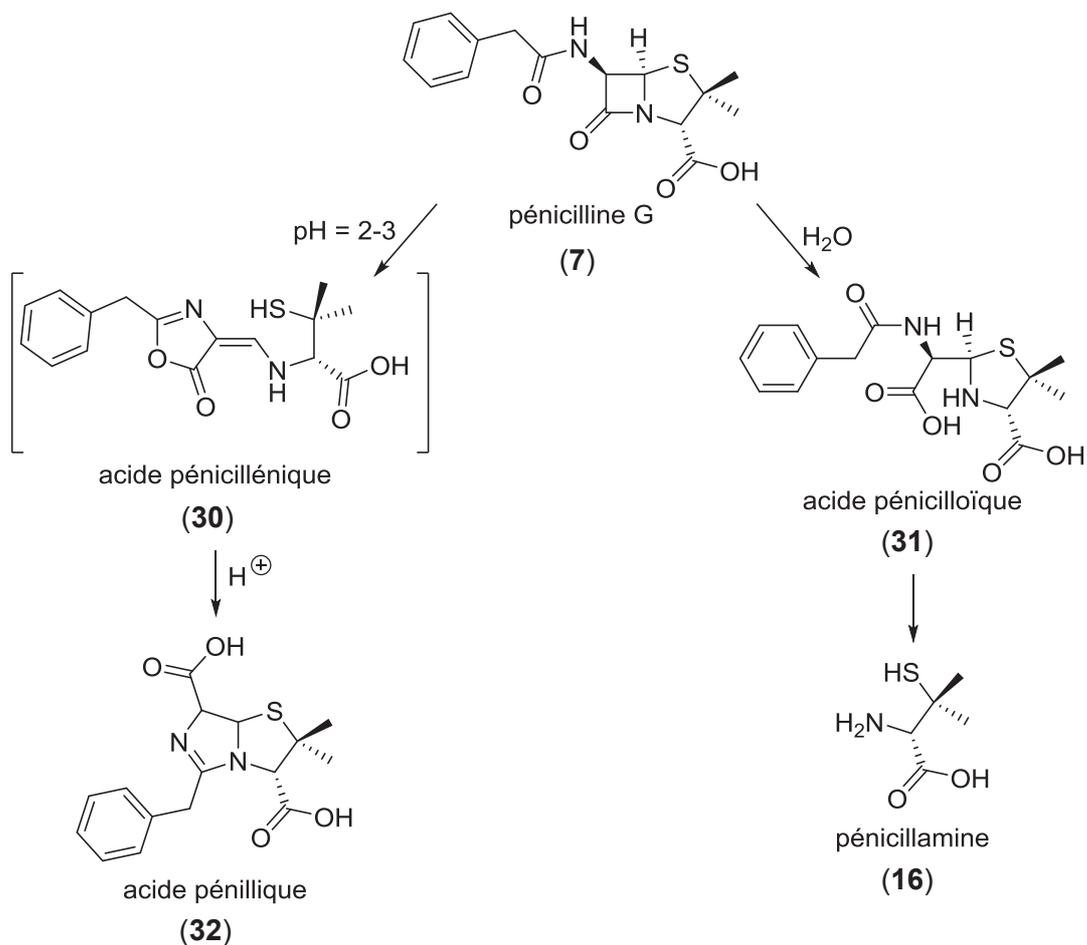


Schéma 12 : Métabolisation de la pénicilline G (7) en milieu aqueux acide

L'acide pénicillénique (30) peut également former des adduits ouverts par les résidus lysines d'une protéine, conduisant à des composés épimérisés en position 6 (la position 5 étant préférentiellement de configuration *R* pour des raisons de compression stérique dans le cycle thiazolidine). Le bioconjugué de la protéine avec le diastéréoisomère 5*R*,6*S* est décrit dans la littérature comme étant probablement plus immunogène que celui issu de son isomère 5*R*,6*R* (Schéma 13).^{97,103}

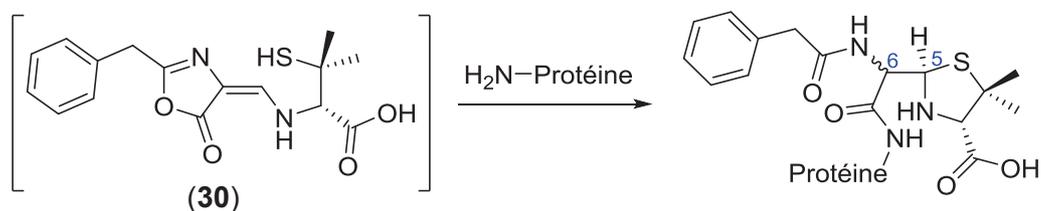


Schéma 13 : Formation du déterminant antigénique majeur épimérisé en passant par l'acide pénicillénique (30)

Le métabolite acide pénicillénique (30) étant détecté *in vivo* en trop faible quantité, nous avons décidé pour ce travail de thèse d'étudier le déterminant antigénique majeur issu de l'ouverture du β -lactame de la pénicilline G (7) par les lysines des protéines.

En résumé, l'utilisation de la pénicilline G (7) a permis à la médecine de progresser depuis sa découverte jusque dans les années 60, mais elle a rapidement montré ses limites. Son spectre d'action contre les bactéries reste limité, et en particulier contre les bactéries Gram- en raison de sa faible biodisponibilité. De plus, l'élimination par la voie rénale de la pénicilline G (7) est très rapide, en deux à trois heures, 50 à 80% de la dose d'antibiotique administrée sont éliminés.¹⁰⁷ L'administration doit donc être fréquente, ce qui est contraignant puisque la pénicilline G (7) n'est administrable que par voie parentérale dû à sa faible stabilité en milieu acide (suc gastrique).⁷⁵ Cette élimination rénale rapide conduit à un recouvrement de plus de 80% du principe actif sous sa forme active, le reste est également excrété dans les urines, mais sous forme d'un métabolite inactif : l'acide pénicilloïque (31).¹⁰⁸ Des tentatives de synthèse de dérivés de la pénicilline ont donc été entreprises pour essayer de contourner les problèmes de la pénicilline G (7).

2) Amoxicilline

L'amoxicilline (AX) (4) est une amino-pénicilline synthétique. Elle possède le spectre d'action le plus large des dérivés pénicillines.⁷⁶ Depuis sa mise sur le marché en 1972, elle a supplanté la pénicilline G (7) et est devenue l'antibiotique de première intention.^{71,76} L'amoxicilline est cependant l'antibiotique possédant la plus forte prévalence allergique (5,1% de la population).⁶⁹

a) L'histoire de l'amoxicilline

En 1959, Batchelor, Doyle, Nayler et Rolinson réussirent à mettre au point une méthode industrielle d'isolement de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) (33), le noyau des pénicillines, à partir de la fermentation de *Penicillium chrysogenum*, en n'introduisant pas de réactif acylant dans le bouillon de culture (Figure 6).¹⁰⁹ Sur ce bicyclic il devient possible de fixer, par synthèse, différentes chaînes latérales et d'obtenir, par la suite, des pénicillines dites hémisynthétiques.

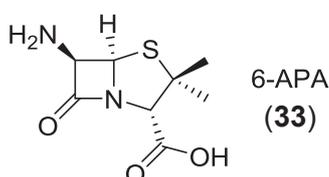


Figure 6 : Structure chimique de l'acide 6-aminopénicillanique (33)

Les chercheurs ont donc voulu améliorer les propriétés de la pénicilline G (7). En premier lieu, son caractère hydrophobe ne lui permet pas d'être administrable par voie orale, de plus son spectre d'action reste faible. Pour l'augmenter et permettre la pénétration dans les bactéries à Gram-, l'hydrophilie de la pénicilline devait être augmentée. Ainsi les amino-pénicillines, avec un groupement

amine libre en plus, présentent un caractère plus hydrosoluble. De plus les chercheurs ont constaté que le spectre d'action de ces amino-pénicillines était bien plus large que celui de la pénicilline G (**7**). En premier lieu l'ampicilline (**34**) fut découverte, en 1961,¹¹⁰ mais elle présente toujours une mauvaise biodisponibilité orale. L'amoxicilline (**4**) fut découverte en 1964,¹¹¹ encore plus hydrophile de par son groupement phénol, et peut de ce fait être administrée par voie orale. C'est grâce à son large spectre d'action et à sa meilleure biodisponibilité orale que l'amoxicilline (**4**) est devenue l'antibiotique de première intention (Figure 7).

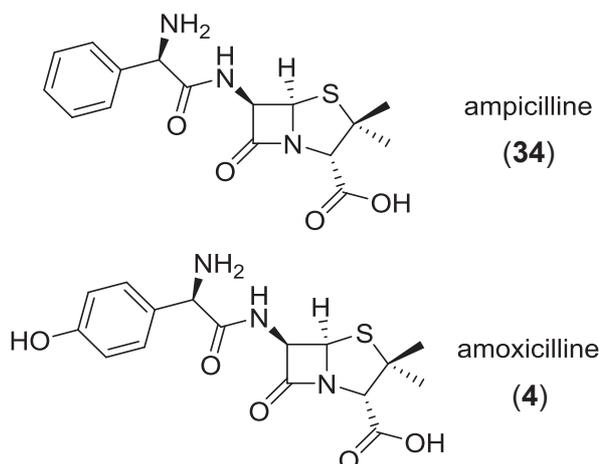


Figure 7 : Structure chimique de l'ampicilline (**34**) et de l'amoxicilline (**4**)

b) Synthèse industrielle

A l'heure actuelle l'amoxicilline (**4**) est l'antibiotique le plus consommé au monde, avec par exemple en France une consommation de 10,7 DDJ/1 000 habitants/jour (Tableau 1).⁷¹ Il a été abordé précédemment la difficulté de synthétiser avec de bons rendements et énantiosélectivement les β -lactames de type pénicilline (*cf.* Introduction partie II 1) b) p.38). Il a donc été difficile d'envisager une synthèse industrielle totalement chimique de ces amino-pénicillines. C'est pourquoi lorsqu'en 1959 Batchelor et ses collaborateurs décrivent une méthode d'extraction de l'acide 6-aminopénicillanique (**33**) c'est par la voie hémisynthétique que les industries pharmaceutiques décident d'accéder aux amino-pénicillines synthétiques telles que l'amoxicilline (**4**).¹⁰⁹

Il existe différentes voies d'accès à ces pénicillines hémisynthétiques. Tout d'abord l'accès à l'intermédiaire acide 6-aminopénicillanique (**33**) peut se faire soit selon la voie décrite par Batchelor et ses collaborateurs en 1959 (une culture de *Penicillium chrysogenum* dans un bouillon n'ayant pas d'agent acylant).¹⁰⁹ Soit à partir d'une pénicilline naturelle (par exemple la pénicilline G (**7**)), obtenue par une culture de *Penicillium chrysogenum*, suivie d'une hydrolyse sélective de la chaîne amide latérale réalisée par voie enzymatique ou par voie chimique.⁸⁸ A partir de cet intermédiaire 6-APA (**33**) l'acylation avec la chaîne désirée peut se faire par voie enzymatique ou par voie chimique (Schéma 14).

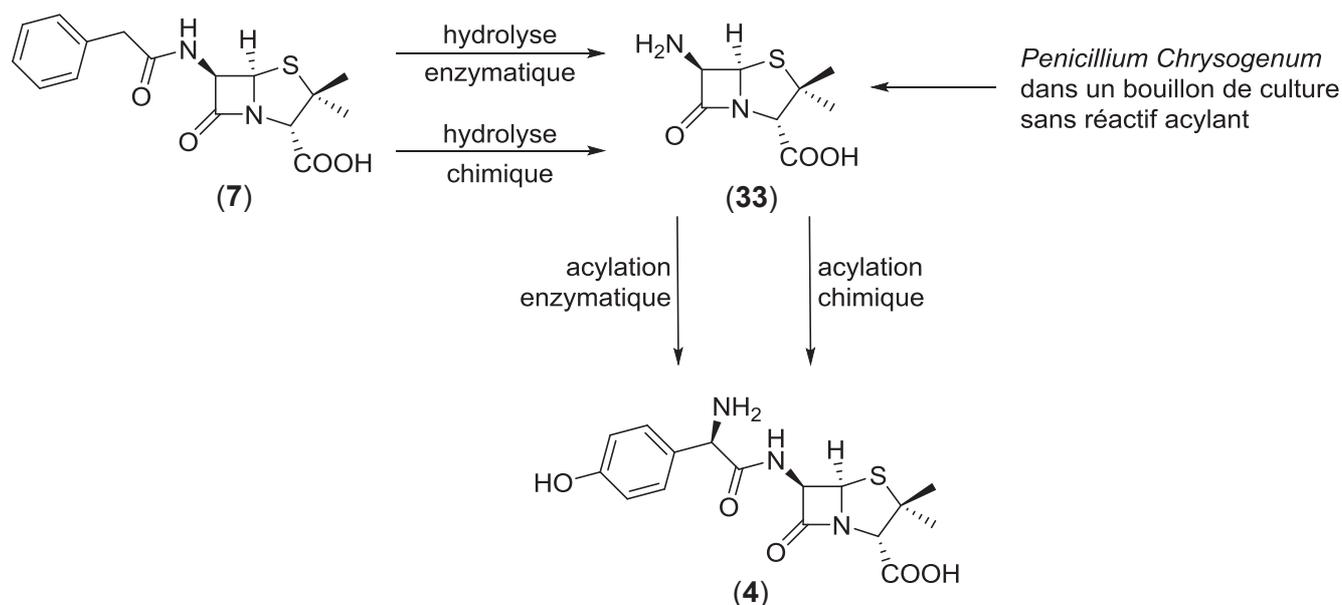


Schéma 14 : Différentes voies d'accès aux pénicillines hémisynthétiques

De nombreuses publications sur l'hydrolyse de la pénicilline G (7) en acide 6-aminopénicillanique (33) par la voie enzymatique parurent en 1960. Entre autre, par l'action d'une hydrolase issue de cellules bactériennes d'*Escherichia coli* avec laquelle les auteurs obtiennent 95% de conversion en 4h,¹¹² ou d'une pénicilline amidase d'*Alcaligenes faecalis* qui conduit à des conversions de l'ordre de 6 mg/mL de culture,¹¹³ ou encore une pénicilline acylase de *Nocardia* qui conduit en 16h à 2,4 g/L de 6-APA (33) à partir de 5 g/L de pénicilline G (7) et 2 g/L de cellules soit un rendement de 80%.¹¹⁴ La voie enzymatique fut stoppée dans les années 70 au profit de la voie chimique qui contournait les inconvénients dus aux enzymes : à savoir les faibles concentrations de produit, les risques de contamination des souches bactériennes ainsi que les coûts élevés engendrés lors de l'isolement du produit.¹¹⁵ Publiée par Weissenburger et Van der Hoeven en 1970, cette synthèse monotope permet d'accéder au 6-APA (33) avec un excellent rendement, sur 4 étapes, de 91%.¹¹⁵ La pénicilline G (7) possédant une fonction amide et une fonction lactame très réactive en condition basique et nucléophile, elle ne pouvait pas être hydrolysée par les méthodes classiques. A partir du sel de potassium de la pénicilline G (7), la fonction acide est protégée par un groupement silyle par le traitement au pentachlorure de phosphore à basse température conduisant au dérivé iminochloré (35). Toujours à froid, un excès de *n*-butanol permet la formation de l'imino-éther (36) par substitution nucléophile. L'hydrolyse ammoniacale suivie du réajustement du pH à 4,1 permet d'isoler l'acide 6-aminopénicillanique (33) qui cristallise avec un excellent rendement (Schéma 15).¹¹⁵

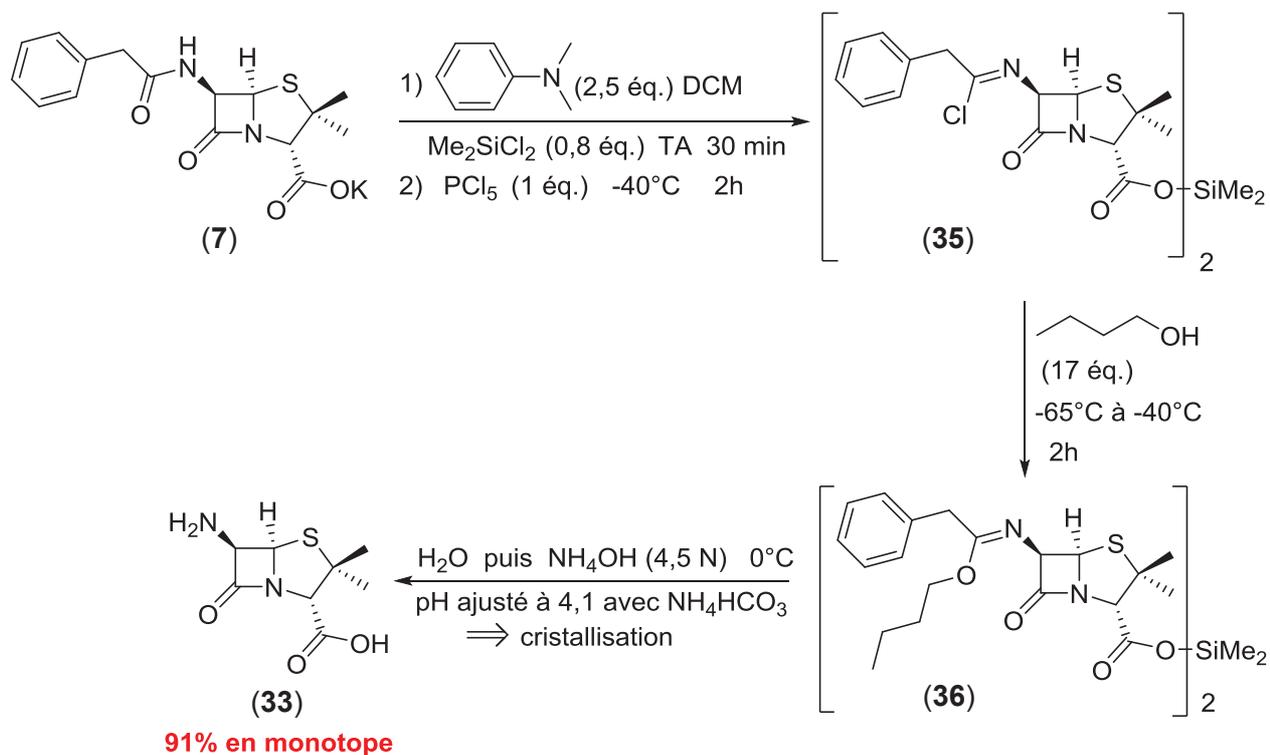


Schéma 15 : Synthèse chimique du 6-APA (33) par Weissenburger¹¹⁵

Seulement cette synthèse chimique posait, à l'échelle industrielle, des problèmes environnementaux et des coûts en solvant et en énergie trop importants pour subsister.⁸⁸ Les voies enzymatiques sont donc à nouveau explorées, contournant les problèmes précédents notamment au niveau du recyclage des enzymes en développant des enzymes immobilisées.¹¹⁶ Les conversions n'étant pas probantes sur des enzymes issues des bactéries natives, les chercheurs ont alors voulu améliorer les souches bactériennes, dans les années 80, la technologie de l'ADN recombinant permit d'obtenir une souche 10 fois plus active que la native.^{116,117} Les meilleures pénicillines amidases, encore utilisées à l'heure actuelle, sont celles issues de souches améliorées d'*Escherichia coli*.¹¹⁶⁻¹¹⁹

La seconde étape dans la synthèse des pénicillines hémisynthétiques consiste en l'acylation de l'acide 6-aminopénicillanique (33) par des dérivés de la *D*-phénylglycine. Elle a été développée également par les deux voies : chimique et enzymatique.

Le brevet relatant de la découverte de l'amoxicilline parut en 1965.¹¹¹ A ce moment, la synthèse mise en place était chimique. Dans le brevet, l'exemple décrit part du mélange racémique de la 4-hydroxyphénylglycine *N,O*-diprotégée (37), mais les inventeurs précisent avoir également réalisé la synthèse en série *D* ainsi qu'en série *L*. Ce composé (37) réagit avec du chloroformiate d'éthyle conduisant à un anhydride mixte (38) qui réagit ensuite avec l'acide 6-aminopénicillanique (33) en milieu basique pour obtenir le sel sodique de l'amoxicilline *N,O*-diprotégée (39) avec un rendement sur les deux étapes de 61%. La déprotection de l'amoxicilline (39) est réalisée par double hydrogénation conduisant quantitativement au produit désiré (4) (Schéma 16). La pureté du produit obtenu n'est toutefois pas discutée.¹¹¹

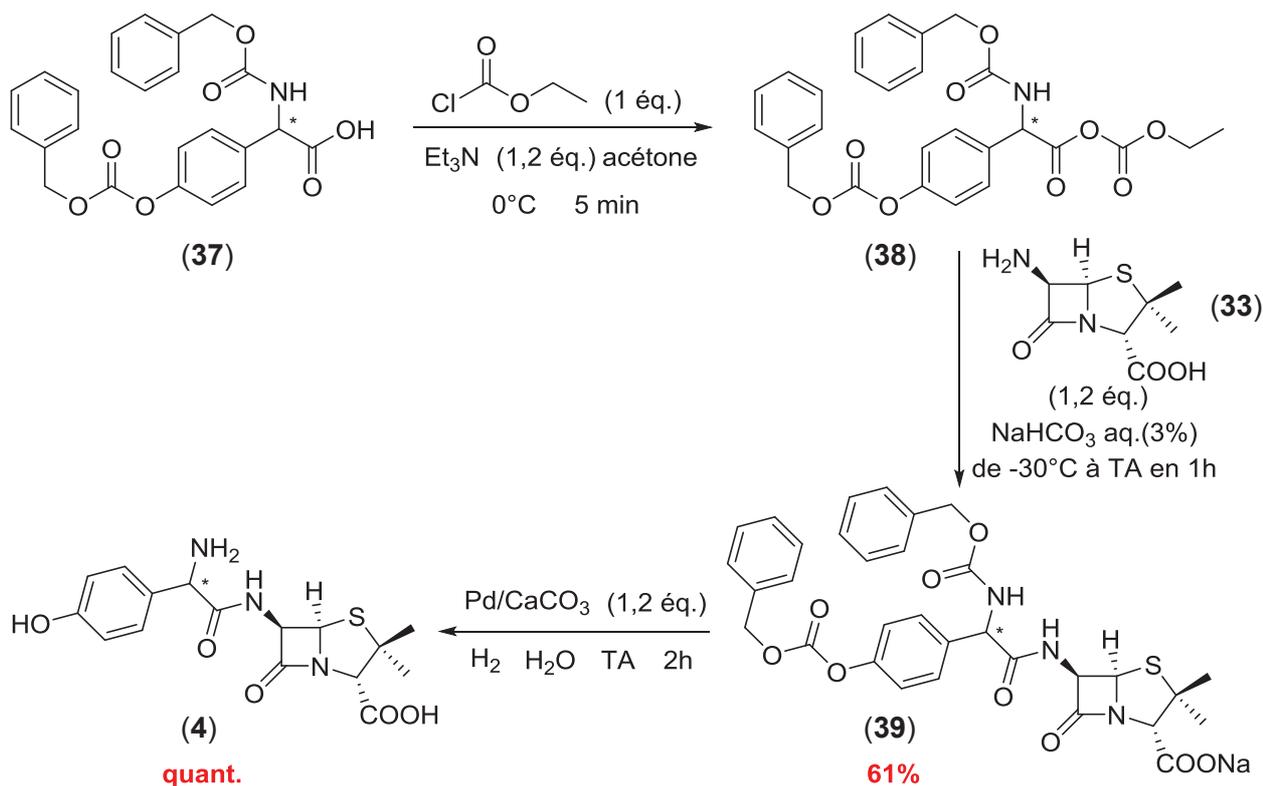


Schéma 16 : Synthèse chimique de l'amoxicilline (4) d'après le brevet de Nayler et Smith¹¹¹

Plus tard, en 1971, un nouveau brevet décrit la synthèse de l'amoxicilline (4) à partir d'un dérivé disilylé du 6-APA (40) et de la *D*-4-hydroxyphenylglycine *N*-protégée (42).¹²⁰ Parmi les différents groupements protecteurs exposés dans le brevet, seuls ceux décrits dans le Schéma 17 ci-après permettent d'accéder au meilleur rendement de 43%, avec une pureté finale de 80%. En modifiant le solvant et le traitement l'inventeur augmente la pureté à 93% mais le rendement diminue à 37%. L'acide 6-aminopénicillanique (33) est silylé sur ses fonctions acide et amine en composé (40) par le chlorure de triméthylsilyle. L'anhydride mixte de la *D*-4-hydroxyphenylglycine *N*-protégée par une fonction 1-méthoxycarbonyl-propèn-2-yl (41) (lui-même obtenu par condensation du chloroformiate d'éthyle sur le sel de sodium de l'acide correspondant (42), appelé sel de Dane) est ensuite couplé au noyau pénicilline suivi d'une hydrolyse en milieu acide pour obtenir l'amoxicilline (4) trihydrate qui cristallise avec un rendement de seulement 43% (Schéma 17).¹²⁰

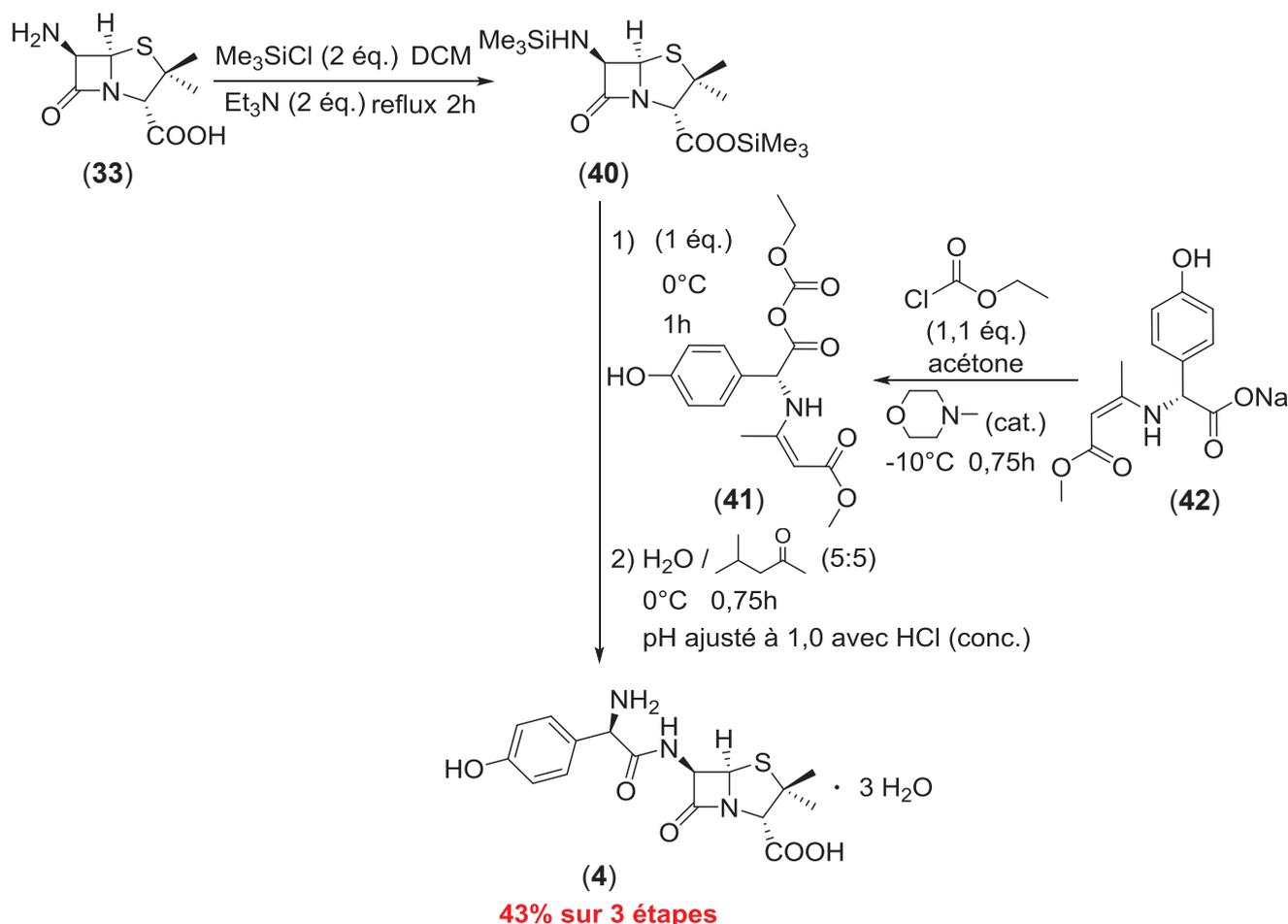


Schéma 17 : Synthèse de l'amoxicilline (4) selon le brevet de Love¹²⁰

En 1978 des chercheurs néerlandais déposent un brevet sur l'optimisation de la synthèse de Love de l'amoxicilline (4) utilisant le sel de Dane (42) (très économique). En jouant sur les températures et les temps de réaction et surtout en contrôlant bien les différents pH, ils améliorent la pureté à 97,7% et le rendement à 83,5%.¹²¹

Lors de la découverte des pénicillines acylases, l'équipe de Huang avait testé l'acylation par voie chimique avec des chlorures d'acides. Ils précisent obtenir de bons rendements, sans plus de détail.¹¹⁴ Cette voie de synthèse n'a pas été exploitée par la suite pour l'amoxicilline mais l'est pour d'autres pénicillines hémisynthétiques telles que l'ampicilline (34).^{119,121}

D'autres chercheurs ont constaté la possibilité de réversion de l'enzyme, offrant la possibilité d'une synthèse enzymatique de nouvelles pénicillines.^{112,113} Par exemple l'équipe de Marconi a mis au point l'hydrolyse de la pénicilline G (7) en acide 6-aminopénicillanique (33) par une pénicilline acylase immobilisée issue d'*Escherichia coli* en 1973,¹¹⁸ puis deux ans plus tard ils exploitaient cette même enzyme immobilisée pour synthétiser l'amoxicilline (4) et autres nouvelles pénicillines par voie enzymatique.¹²² En milieu légèrement basique (pH = 8) l'enzyme tend à hydrolyser la pénicilline alors qu'en milieu légèrement acide (pH = 6) voire neutre elle tend à la synthétiser. Les auteurs ont donc effectué leur synthèse à partir du 6-APA (33) et de la *D*-4-hydroxyphénylglycine (43) à un pH neutre. Une conversion maximale de 30% est obtenue avant d'observer la prédominance de l'hydrolyse sur

l'acylation, conduisant à de faibles concentrations d'amoxicilline (2,3 $\mu\text{mol/mL}$).¹²² De nombreuses améliorations ont vu le jour au fur et à mesure du temps, en 1996 un procédé de préparation de l'amoxicilline (**4**) en continu est breveté. Permettant d'obtenir des rendements allant jusqu'à 90% à partir de l'acide 6-aminopénicillanique (**33**) et de la *D*-4-hydroxyphénylglycine activée avec une productivité allant jusqu'à 156 mmol/h/L.¹²³ Environ 900 g d'amoxicilline trihydrate sont produits en 14h. L'équilibre acylation/hydrolyse est déplacé en faveur de l'acylation grâce à la faible solubilité de l'amoxicilline qui précipite en solution très concentrée (proche de la saturation en substrat) et est collectée hors du réacteur et n'est donc que faiblement disponible pour l'hydrolyse.¹²³

Mais, finalement, malgré tous les progrès en vue d'une synthèse industrielle enzymatique c'est toujours la méthode chimique à partir du sel de Dane (**42**) qui est utilisée à l'heure actuelle pour synthétiser l'amoxicilline (**4**) à l'échelle industrielle.^{88,111,119,124,125}

c) Le mode d'action de l'amoxicilline

Le mode d'action de l'amoxicilline (**4**) est le même que celui de la pénicilline G (**7**). Elle est capable de pénétrer dans les bactéries Gram- en raison de sa plus forte hydrophilie par rapport à la pénicilline G (**7**) (Tableau 2). En effet nous avons vu précédemment (*cf.* Introduction partie II 1) c) p.42) que les bactéries à Gram- possèdent des porines dans leur membrane externe qui permettent le passage de petites molécules préférentiellement hydrophiles. Le caractère plus hydrophile de l'amoxicilline (**4**) est donc ce qui lui permet de plus facilement passer cette membrane externe par rapport à la pénicilline G (**7**). Ce qui lui offre donc un spectre d'action plus large touchant à la fois les bactéries Gram+ et un grand panel de bactéries Gram-.

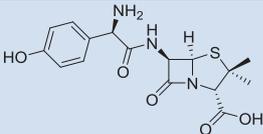
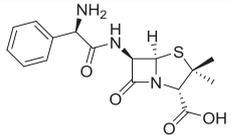
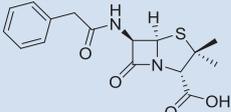
Médicament	Structure	logP
Amoxicilline (4)		0,87
Ampicilline (34)		1,35
Pénicilline G (7)		1,83

Tableau 2 : logP de l'amoxicilline (**4**), l'ampicilline (**34**) et de la pénicilline G (**7**)

d) Le mode d'hapténisation de l'amoxicilline

L'amoxicilline (**4**) a une masse moléculaire de 365,40 g/mol. Elle est, comme la pénicilline G (**7**), un haptène. Son mécanisme d'hapténisation principal est le même que celui de la pénicilline G (**7**) (cf. Introduction partie II 1) d) p.45) et des autres pénicillines,¹²⁶⁻¹²⁸ c'est-à-dire par l'ouverture du β -lactame par les groupements nucléophiles des protéines et plus particulièrement par les résidus lysines.¹²⁹

L'amoxicilline (**4**) est métabolisée moins rapidement que la pénicilline G (**7**) car elle est plus stable chimiquement : la formation des déterminants antigéniques mineurs comme pour la pénicilline G (**7**) n'a d'ailleurs jamais été jusqu'à ce jour observée.¹²⁹

3) Sulfaméthoxazole

Le sulfaméthoxazole (SMX) (**5**) (Figure 8) a une prévalence de 3,4% lorsqu'il est associé au triméthoprime (usuellement associés pour éviter les résistances et permettre une action plus rapide contre les bactéries).^{69,130}

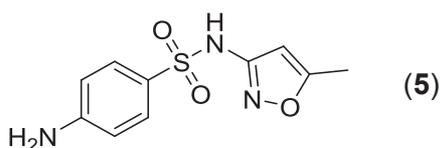


Figure 8 : Structure chimique du sulfaméthoxazole (**5**)

a) L'histoire du sulfaméthoxazole

Pendant la première guerre mondiale, de nombreux soldats blessés décèdent du fait d'infections. C'est pourquoi, à cette époque, la recherche d'agents anti-infectieux est très active. En Allemagne, deux chimistes de chez Bayer, Josef Klarer et Fritz Mietzsch synthétisent la sulfamidochrysoïdine qui est testée sur des infections chez le rat et démontrée active en décembre 1931. Entre 1932 et 1935, le médecin allemand Gerhard Domagk du groupe Bayer découvre les propriétés antibactériennes du Prontosil (le chlorhydrate de sulfamidochrysoïdine) (**44**) (Figure 9), sur des patients. Le Docteur Domagk obtient un prix Nobel en 1939 pour la découverte de l'activité thérapeutique du Prontosil (**44**).⁷⁶

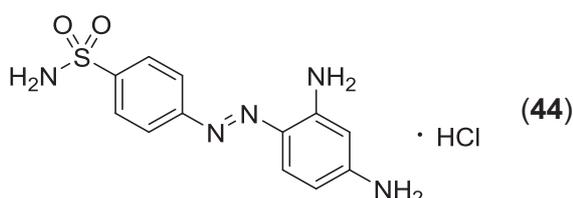


Figure 9 : Structure chimique du Prontosil (chlorhydrate de sulfamidochrysoïdine) (**44**)

L'efficacité de cet antibiotique suscite l'intérêt de plusieurs chercheurs dans toute l'Europe, notamment en France, où l'équipe de l'institut Pasteur d'Ernest Fourneau, démontre que le Prontosil (**44**) est métabolisé en sulfanilamide (**45**) dans l'organisme et constitue le métabolite actif contre les bactéries (Figure 10). Il est commercialisé dès 1937 en France, en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis.⁷⁶

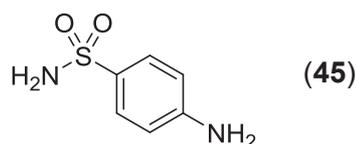


Figure 10 : Structure chimique du sulfanilamide (**45**), métabolite du Prontosil, principe actif contre les bactéries

La famille des sulfamides s'est par la suite agrandie et de nombreuses autres molécules ont été synthétisées et testées dont le sulfaméthoxazole (**5**) en 1956.^{76,131} Les sulfamides deviennent ainsi les premiers antibiotiques synthétiques, mais leur spectre d'action est relativement étroit et leur métabolisation par l'organisme fait souvent apparaître des produits toxiques, ce qui contribue encore au développement de la pénicilline.

b) Synthèse industrielle

La synthèse industrielle du sulfaméthoxazole (**5**) est classique. Elle consiste en une condensation du 3-amino-5-méthylisoxazole (**46**) avec un acide *p*-aminobenzènesulfonique activé (par exemple en chlorure de sulfonyle ou en ester), ou avec un acide *p*-aminobenzènesulfonique activé *N*-protégé (par exemple par un groupement acétyle comme dans le composé (**47**), activé par un chlorure de sulfonyle représenté dans le Schéma 18 ci-après) menant au composé de condensation (**48**) avec d'excellents rendements. S'en suit une réaction de déprotection de l'amine aromatique primaire conduisant au produit désiré (**5**) en peu d'étapes et avec des rendements quasiment quantitatifs (Schéma 18).¹³¹

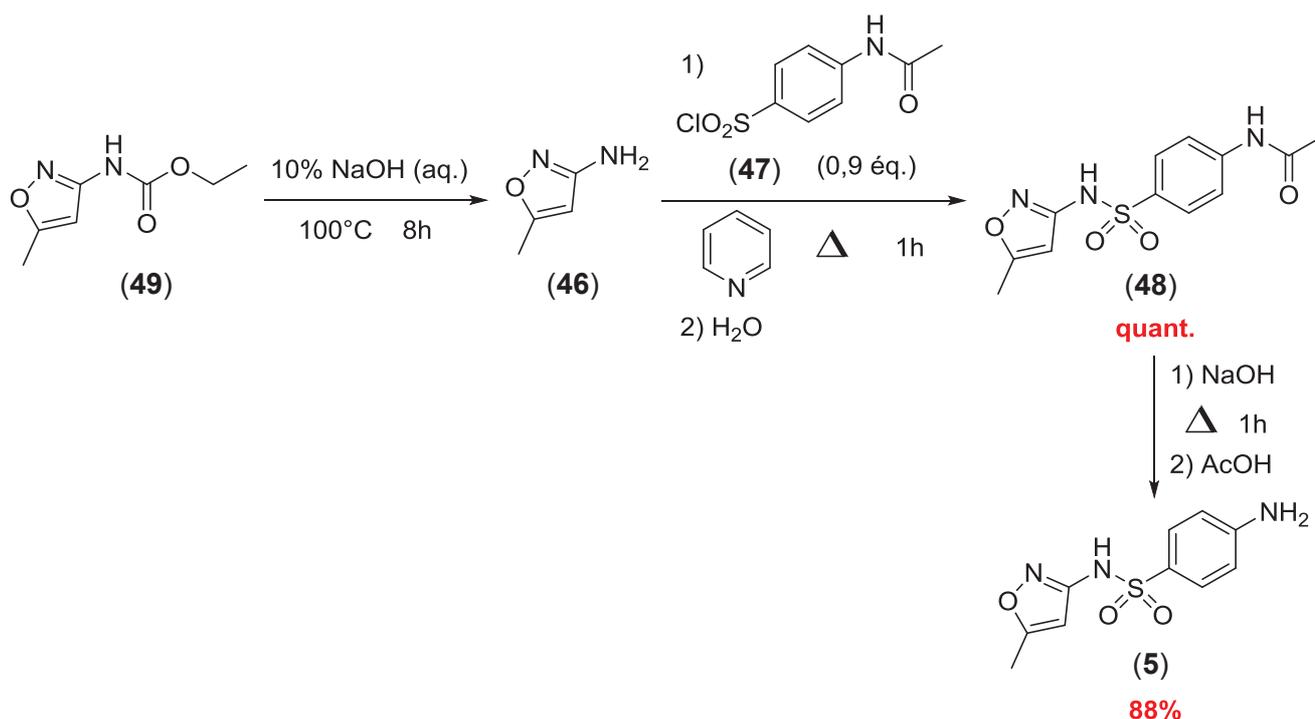


Schéma 18 : Synthèse industrielle du SMX (5)¹³¹

c) Le mode d'action du sulfaméthoxazole

Le mécanisme d'action du SMX (5) met en jeu l'anion dihydrofolate (FAH₂) (50) et son analogue réduit : l'anion tétrahydrofolate (FAH₄) (51). Dans l'organisme le FAH₄ (51) est synthétisé à partir du FAH₂ (50) par l'action d'une enzyme : la dihydrofolate réductase (Schéma 19). Le FAH₄ (51) est vital pour l'organisme, il intervient notamment dans la biosynthèse de certains acides aminés ainsi que certains acides nucléiques.¹³⁰

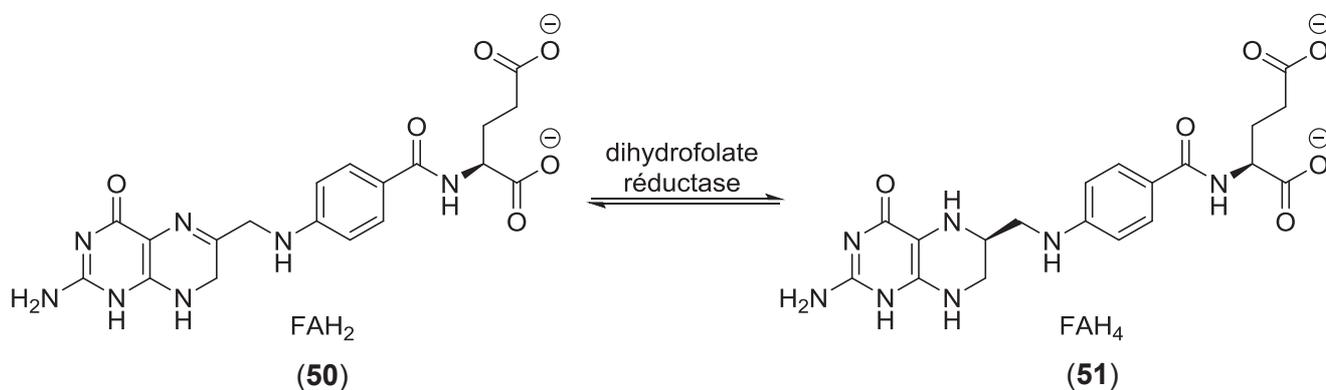


Schéma 19 : Synthèse du FAH₄ (51) à partir du FAH₂ (50) via la dihydrofolate réductase

La sélectivité du SMX (**5**) réside dans l'une des différences entre les bactéries et les mammifères : les mammifères trouvent le FAH₂ (**50**) dans leur alimentation alors que les bactéries doivent le synthétiser. Il en est de même pour le FAH₄ (**51**) auquel les bactéries n'accèdent que par le biais de la dihydrofolate réductase. Le SMX (**5**), et plus particulièrement le sulfanilamide (**45**) qui en découle est un isostère de l'acide *para*-aminobenzoïque (**52**) qui intervient dans la synthèse *de novo* de FAH₂ (**50**) par les bactéries (Schéma 20). Ces dernières insèrent le sulfanilamide (**45**) dans leur métabolisme, il est alors un inhibiteur compétitif d'une des enzymes impliquées dans la synthèse de FAH₂ (**50**) : la dihydroptéroate synthétase. En empêchant la synthèse du FAH₂ (**50**) par les bactéries, elles n'ont plus accès au FAH₄ (**51**), ni à la biosynthèse de certaines bases de leur ADN. Elles ne peuvent donc plus se multiplier, ce qui fait du sulfaméthoxazole (**5**) un antibiotique à effet bactériostatique.¹³⁰

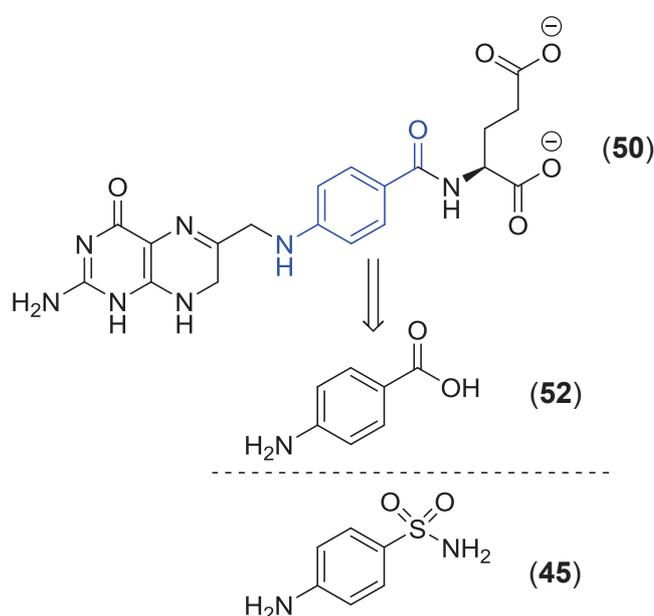


Schéma 20 : Structures isostères entre le sulfanilamide (45**) et l'acide *p*-aminobenzoïque (**52**), précurseur du FAH₂ (**50**)**

Pour renforcer cet effet bactériostatique le SMX (**5**) est usuellement associé au triméthoprime (**6**). Cette association permet également de réduire les effets de résistance étant donné que les deux antibiotiques ont un mécanisme d'action différent. Le triméthoprime (**6**) agit comme inhibiteur compétitif de l'enzyme dihydrofolate réductase, empêchant la synthèse de FAH₄ (**51**) à partir du FAH₂ (**50**) qui aurait été synthétisé avant l'action du SMX (**5**). Il tient sa spécificité du fait des faibles différences structurales existant entre l'enzyme des bactéries et celle des mammifères. Ce double mode d'action par l'association du triméthoprime (**6**) et du sulfaméthoxazole (**5**) permet un épuisement encore plus rapide des FAH₄ (**51**) restants, stoppant très vite la croissance des bactéries.^{130,132}

d) Les modes de présentation du sulfaméthoxazole aux lymphocytes T

Comme vu précédemment (cf. Introduction partie I 2) p.30), il existe deux modes de présentation du SMX (**5**) aux lymphocytes T. Le p-i concept ne nécessite pas la formation d'un adduit acide aminé-antibiotique et ne fera donc pas partie de notre étude. Le second mode repose sur la théorie de l'haptène, comme vu précédemment pour les pénicillines.

Le SMX (**5**) a une masse moléculaire de 253,28 g/mol. Il doit se lier à une protéine pour être immunogène, mais il doit subir une métabolisation enzymatique avant de pouvoir se lier. C'est donc un pro-haptène. Le sulfaméthoxazole (**5**) va d'abord subir une oxydation par les cytochromes P450 (CYP2C9 ou CYP2C8)¹³³ ou par la myéloperoxydase (enzyme présente dans les cellules dendritiques et les kératinocytes),¹³⁴ et passer de sa forme amine à une forme hydroxylamine (SMX-HA) (**53**). Cette hydroxylamine (**53**) subit ensuite spontanément une oxydation en dérivé nitroso (SMX-NO) (**54**) qui est très réactif et va donc se lier aux protéines, et plus particulièrement aux dérivés cystéines non impliqués dans un pont disulfure.^{67,133,135-137} Une publication de Callan et ses collaborateurs émet l'hypothèse que les dérivés cystéines impliqués dans l'hapténisation du SMX-NO (**54**) seraient oxydés sous forme de dérivés acides sulféniques et donneraient donc lieu à des dérivés *N*-hydroxysulfonamides (Schéma 21-A).¹³⁵⁻¹³⁷ Sans cette oxydation, les dérivés obtenus seraient les mêmes que ceux observés quand le glutathion (**55**) sous sa forme SH se lie directement avec le dérivé nitroso du SMX (**54**). Le couplage conduit au dérivé semimercaptal (*N*-hydroxysulfénamide) (**56**) qui se réarrange rapidement ($t_{1/2}=2,5$ min)¹³⁵ en dérivé sulfonamide (**57**) plus stable (Schéma 21-B).¹³⁵⁻¹³⁷ Seulement le dérivé sulfonamide (**57**) n'est pas stable au chauffage, ainsi qu'aux conditions acides, comme celles présentes lors de la digestion des protéines par les cellules dendritiques. Ce qui pourrait expliquer qu'après un traitement de 15 minutes à 55°C de leurs échantillons de HSA hapténisé, Callan *et al.* n'observent que le dérivé *N*-hydroxysulfonamide.¹³⁸

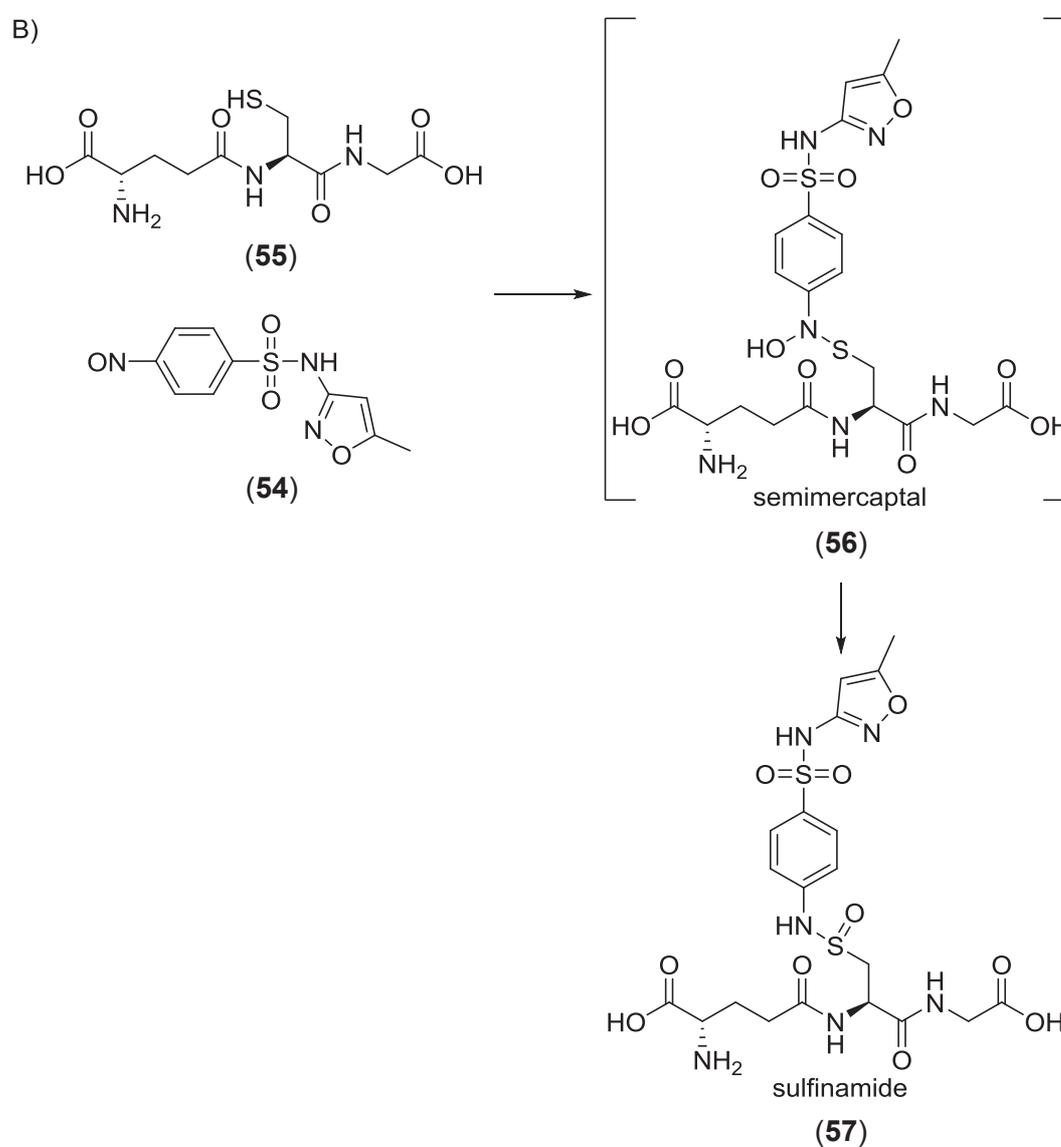
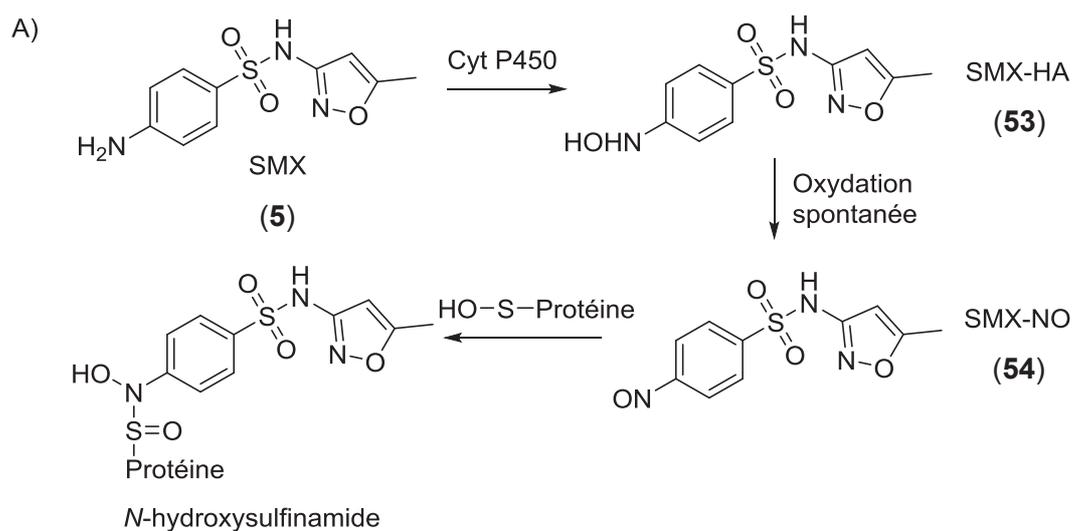


Schéma 21 : Hapténisation du métabolite nitroso du sulfaméthoxazole (54) par les dérivés cystéines oxydés d'une protéine (A) ou par le glutathion (55) (B)¹³⁵

Généralement la voie de dégradation du SMX (5) est une *N*-acétylation dans le foie et l'oxydation par les cytochromes ne se produit que sur une petite quantité de l'antibiotique. Cependant certains patients dits « acétyleurs lents » ainsi que ceux atteints de pathologies telles que le VIH, qui perturbent la voie d'acétylation, ont une plus grande prévalence d'hypersensibilité au SMX (5).²¹

Connaissant les formes des haptènes pour les trois antibiotiques d'intérêt, la deuxième étape du processus immunitaire reste à étudier. Pour rappel cette deuxième étape consiste en la digestion par les cellules dendritiques de la protéine avec l'antibiotique hapténisé, et l'identification des peptides en découlant qui déclencheront la réponse des lymphocytes T.

III. **Projet de recherche**

L'objectif de ce projet est de trouver des peptides immunogènes constituant des épitopes dans le but de développer des nouvelles méthodes de diagnostic précoce de l'allergie. Il s'agit donc de l'antibiotique étudié, qui doit être présenté aux lymphocytes T *via* un couplage avec un petit peptide, issu de la digestion d'une protéine porteuse. Nous ferons donc un état de l'art afin de choisir la protéine porteuse la plus pertinente et d'identifier les résidus des acides aminés susceptibles d'être hapténisés par les antibiotiques de notre étude. De même, nous évaluerons les méthodes de sélection à disposition, ainsi que les méthodes de synthèse des peptides potentiellement épitopes nécessaires à notre étude.

1) Etude sur une protéine modèle

a) Etat de l'art

Comme vu précédemment, les antibiotiques étudiés sont des haptènes ou pro-haptènes. Ils se lient à une protéine pour devenir les antigènes reconnus par le système immunitaire. L'albumine du sérum humain (HSA) est la protéine la plus abondante du sérum. Son rôle est de maintenir le pH et la pression osmotique dans le corps humain.¹³⁹ Elle est également connue pour être une bonne protéine de transport grâce à ses nombreuses cavités, comme le démontre sa structure radiocristallographique obtenue sans ligand avec une résolution de 3,2 Å (PDB : 4K2C).¹⁴⁰ Les substrats connus pour être transportés par la HSA sont les métaux, les acides gras, les acides aminés mais également les médicaments et leurs métabolites.^{139,141}

Dans la littérature, des publications relatent déjà de l'accroche des antibiotiques de type β -lactames sur la HSA.^{98,99,126-128,142-144} Mais la détermination des acides aminés hapténisés dans la séquence de la protéine ne s'est faite que plus tard. Pour la pénicilline G (7), c'est en 1987 que Lafaye et Lapresle initient la recherche des sites de fixation en utilisant la technique de la

fragmentation de protéine par un traitement chimique. Dans cette publication, ils utilisent le bromure de cyanogène (CNBr) pour fragmenter la HSA isolée du sérum d'un patient traité à la pénicilline G (7) pendant 20 à 40 jours.¹⁴⁵ Le bromure de cyanogène réagit avec les méthionines de la séquence de la protéine en formant une imino-lactone qui s'hydrolyse en milieu acide en homosérine lactone fractionnant ainsi la protéine en deux (Schéma 22).^{146,147}

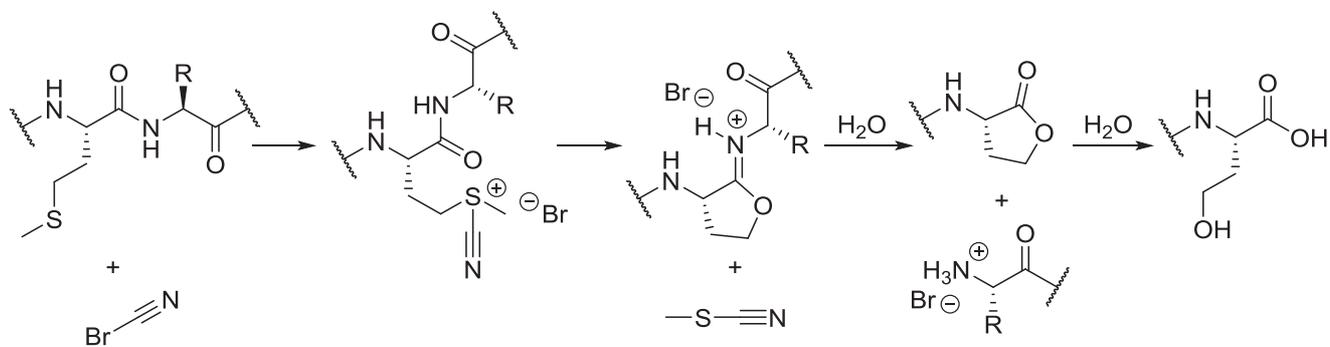


Schéma 22 : Mécanisme de fragmentation d'une protéine par CNBr^{146,147}

Il n'y a que 6 méthionines dans la HSA ce qui conduit après l'action du CNBr à trois grands fragments. Lafaye et Lapresle trouvent que la pénicilline G (7) a hapténisé deux des fragments : celui qu'ils nomment A qui va de l'acide aminé 299 au 585 ainsi que celui qu'ils appellent C qui va de l'acide aminé 124 au 298.¹⁴⁵ L'année suivante, la suite de leur travaux est publiée avec la détermination des deux sites de fixation précédemment décrits.¹⁴⁸ Pour ce faire, des digestions tryptiques des deux fragments en question ont été réalisées. La trypsine est une enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques d'une protéine en C-terminal de chaque résidu lysine et arginine de la séquence sauf si l'acide aminé suivant est une proline, ou si l'acide aminé visé est modifié au niveau de son extrémité N^{δ} -NH₂. Les peptides hapténisés sont alors isolés *via* une colonne d'affinité chargée avec un anticorps anti-pénicilline G. Deux peptides hapténisés sont découverts. La détermination de l'acide aminé porteur de l'antibiotique reste encore hypothétique. Lafaye et Lapresle supposent que l'acide aminé hapténisé ne peut pas être une lysine de par sa trop forte basicité. Etant donné le pH physiologique à 7,4 et le pKa d'une histidine de 7, ils pensent que la pénicilline s'est fixée sur les histidines 146 et 338.¹⁴⁸

Seulement, 4 mois plus tard, une publication de Yvon et Wal contredit les hypothèses précédentes et désigne la lysine 199 comme un site de fixation de la pénicilline G (7).¹⁰⁰ Dans cette publication le traitement de la protéine (issue de séra de patients traités 22 jours par la pénicilline G (7)) est le même que précédemment (CNBr puis digestions tryptiques), mais la séparation des différents peptides générés s'effectue par HPLC. La technique de séquençage des peptides hapténisés obtenus est également différente, et plus précise que celle de Lafaye et Lapresle. Les auteurs ont alors des résultats différents et trouvent la lysine 199 comme porteuse du médicament.¹⁰⁰ Cinq mois plus tard, les mêmes auteurs proposent les lysines 190 et 195 (ainsi que probablement la

sérine 193) comme autres sites d'hapténisation de la pénicilline G (7).¹⁰¹ Des recherches complémentaires ont été menées *in vitro* par la formation de bioconjugués HSA-PG en incubant de la HSA avec la pénicilline G (7) à 37°C pendant toute une nuit, dans un milieu tamponné à un pH de 7,5 pour mimer les conditions physiologiques. Les mêmes résultats confirment ceux obtenus *in vivo*. Les histidines 146 et 338 de l'étude de Lafaye et Lapresle ne sont pas identifiées, mais les auteurs ne contredisent pas ces résultats étant donné qu'ils n'ont identifié que 80% des sites hapténisés. Mais ils démontrent que la modification des lysines est plus probable que celle des histidines par l'observation d'une bisalbuminémie transitoire chez les patients traités à la pénicilline G (7), due à l'hapténisation d'une partie de la HSA.^{149,150} Yvon et Wal confirment l'hypothèse mécanistique de liaison de la pénicilline aux lysines, postulée par l'équipe de Yamana en 1975. Ce mécanisme préconise le passage par une liaison entre la pénicilline et une sérine en ester instable qui subirait un transfert d'acyle sur une lysine proche (Schéma 23).¹⁵¹

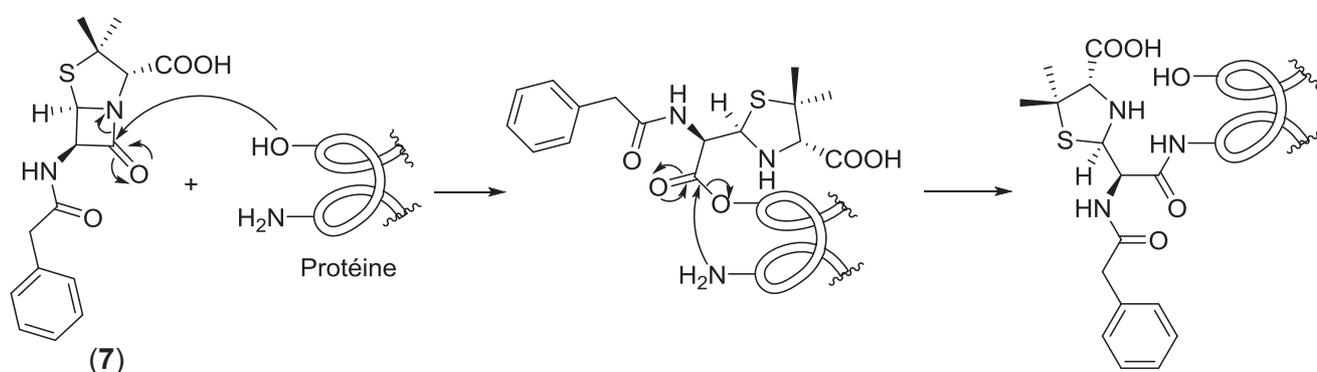


Schéma 23 : Mécanisme supposé de l'hapténisation d'une protéine par Yamana et al.¹⁵¹

Ce mécanisme est conforté par l'observation d'une faible hapténisation de la sérine 193, proche de la lysine 195. De même pour les lysines 190 et 199, situées à une distance de deux acides aminés d'une sérine.¹⁰¹ L'étude est alors encore approfondie et focalisée sur le deuxième fragment de HSA désigné comme hapténisé (après le traitement au CNBr). S'en suit en 1990 la publication de trois nouvelles lysines porteuses du dérivé pénicilline : la 432, la 541 et la 545.¹⁰² Encore une fois, les mêmes résultats sont observés au départ de bioconjugués HSA-PG de synthèse et au départ de séra de patients. La lysine 432 est située à deux acides aminés d'une sérine, par contre ce n'est pas le cas des deux autres lysines. Le mécanisme de Yamana est maintenu par les auteurs de par la structure tertiaire de la protéine qui pourrait impliquer qu'une sérine soit proche des deux autres lysines ; mais ils restent très hypothétiques en conclusion de leur publication.¹⁰²

Il faut alors attendre 2011 pour qu'une nouvelle étude sur l'identification des sites de fixation de la pénicilline G (7) sur la HSA issue de séra de patients soit entreprise par Meng et ses collaborateurs.¹⁰³ La spectrométrie de masse, et notamment la technique de la spectrométrie de masse dite « tandem » (également abrégée MS/MS) est alors devenue une technique couramment utilisée en protéomique. Grâce à cette technique et des outils plus précis qu'en 1990, Meng et ses

collaborateurs parviennent à détecter 14 lysines hapténisées par la pénicilline G (7). Les 6 mêmes que Yvon et ses collaborateurs (190, 195, 199, 432, 541 et 545) ainsi que 8 nouvelles : les lysines 20, 137, 159, 212, 351, 372, 436 et 525.¹⁰³ Aucun autre résidu n'a été détecté comme étant hapténisé, les auteurs expliquent cette observation par la trop faible stabilité des adduits pénicilline G (7)-sérine, -histidine ou -cystéine, mais également par la possible transacylation décrite par Yamana et ses collaborateurs en 1975.

Pour ce qui est de l'amoxicilline (4) peu d'études ont été réalisées, mais cet antibiotique se comporte comme la pénicilline G (7). Cependant sa fixation protéique est moindre comparée aux pénicillines naturelles.¹⁵² Ce phénomène est corrélé dans la littérature à la lipophilie des médicaments, qui exacerbe la fixation aux protéines.^{153,154} L'amoxicilline (4) étant moins lipophile que les pénicillines naturelles telles que la pénicilline G (7), comme déjà évoqué dans le Tableau 2 (cf. Introduction partie II 2) c) p.54), elle se lie donc moins aux protéines.

Récemment une publication de Ariza *et al.* présente une étude fondamentale sur l'hapténisation de la HSA par l'amoxicilline (4) et l'identification des sites de fixation sur des bioconjugués en utilisant une nouvelle technique de spectrométrie de masse haute résolution : un orbitrap couplé à une nano-LC.¹²⁹ Grâce à cet outil plus précis, 6 lysines hapténisées par l'amoxicilline (4) ont pu être identifiées : les 190, 199, 351, 432, 541 et 545. En moyenne 2 molécules d'amoxicilline (4) sont liées à la HSA après une incubation à 37°C pendant 16h de HSA à 10 mg/mL et d'amoxicilline (4) à 1 mg/mL dans un tampon à pH 7,4. Dans cette publication, le mécanisme est le même que proposé par Llinas et Page en 2004, qui implique une catalyse acide intramoléculaire de l'ouverture du β -lactame qui serait engendrée par l'ammonium de la lysine.¹⁵⁵ La transamidation à partir d'un ester de l'amoxicilline ouverte par une sérine (comme vu pour la pénicilline G (7) au Schéma 23 p.63) n'est pas évoquée. L'étude est basée sur une publication d'Aldini de 2006 exposant la modification covalente de la HSA par le 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal (HNE), où seules des lysines, histidines et cystéines sont modifiées, amenant les auteurs à la conclusion de la non-nucléophilie des sérines.¹⁵⁶ Ariza et ses collaborateurs ont donc réalisé des tests sur la réactivité des lysines, histidines et cystéines ainsi que l'amine terminale des peptides vis-à-vis de l'ouverture du β -lactame, en excluant les sérines. Les lysines sont démontrées comme les plus réactives (12%), suivies par les histidines (3%) ; les cystéines ainsi que l'amine terminale des peptides ont une réactivité négligeable (<0,5%). Pour ce qui est du peptide contenant une histidine, la modification n'est pas stable et ne résiste pas à la deuxième collision effectuée pour l'acquisition d'un spectre MS/MS. La nature de la liaison entre l'antibiotique et une histidine n'est donc pas déterminable.¹²⁹

Un récapitulatif des différents sites identifiés sur la HSA comme hapténisés par la pénicilline G (7) ou l'amoxicilline (4) est présenté dans le Tableau 3 ci-après, avec en gras les sites qui sont retrouvés en commun dans les 3 études.

β -lactame	Sites identifiés	Référence
Pénicilline G (7)	K190 , K195, K199 , K432 , K541 , K545	Yvon <i>et al.</i> ¹⁰⁰⁻¹⁰²
Pénicilline G (7)	K20, K137, K159, K190 , K195, K199 , K212, K351, K372, K432 , K436, K525, K541 , K545	Meng <i>et al.</i> ¹⁰³
Amoxicilline (4)	K190 , K199 , K351, K432 , K541 , K545	Ariza <i>et al.</i> ¹²⁹

Tableau 3 : Récapitulatif des sites identifiés comme étant hapténisés par les β -lactames après différentes études réalisées sur la HSA

En ce qui concerne le SMX (**5**), dès 1994, des chercheurs étudiaient l'hapténisation de la HSA par le SMX (**5**).¹⁵⁷ Les études sont moins axées sur le nombre d'acides aminés hapténisés étant donné qu'il a été démontré qu'il se liait covalentement *via* son métabolite nitroso aux dérivés cystéines grâce à des études préliminaires sur le glutathion (**55**).¹⁵⁸ Naisbitt et ses collaborateurs tentent alors de trouver d'autres résidus nucléophiles avec lesquels le SMX (**5**) pourrait réagir, mais aucun n'est impacté.¹⁵⁹ Ils montrent ensuite que la thiolation chimique de la HSA conduit à une augmentation de l'hapténation par SMX-HA (**53**) et SMX-NO (**54**) *in vitro*.²³ La thiolation chimique consiste en l'introduction de thiol sur les dérivés amines d'une protéine par l'action de la *N*-acétylhomocystéine thiolactone (**58**) (Schéma 24).¹⁶⁰

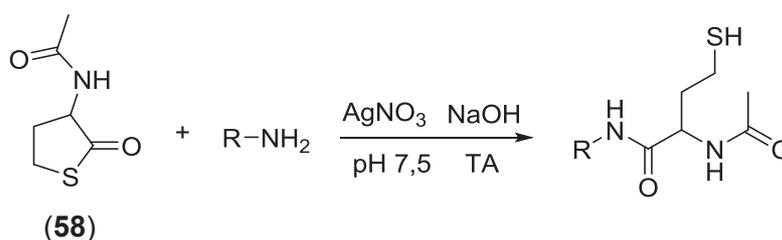


Schéma 24 : Exemple de thiolation d'un dérivé amine

Le seul résidu cystéine de la HSA n'étant pas impliqué dans un pont disulfure est la cystéine 34, de nombreuses études ont donc été menées sur la liaison covalente entre les métabolites du SMX-HA (**53**) ou -NO (**54**) et la HSA.^{23,136,161,162} Cependant, seule une étude de Callan et ses collaborateurs présente la chimie des adduits formés lors de cette hapténisation. L'hapténisation de la HSA est réalisée en incubant 10 équivalents de SMX-NO (**54**) (dans 1% de DMSO) avec 1 équivalent de HSA dans un tampon à pH = 7,4, à température ambiante pendant 1h. Les peptides sont analysés après digestion trypsique par nano-LC-MS/MS, après un traitement préliminaire au DTT de 15 minutes à 55°C. Cette température élevée pourrait avoir cassé certains adduits et ne laisser à leur détection que le dérivé *N*-hydroxysulfonamide (**57**) évoqué précédemment (*cf.* Introduction partie II 3) d) p.59).¹³⁵

D'autres études ont été menées sur des composés subissant la même voie de métabolisation que le SMX (**5**) (de l'amine en hydroxylamine puis en nitroso (cf. Schéma 21 p.60)). Ils se lient au même acide aminé (C34) par le même mécanisme et sont décrits dans une publication de Peng et Turesky publiée en 2013.¹⁶³ D'après des observations ultérieures, après un couplage entre la HSA et un dérivé hydroxylamine, un dérivé sulfinamide (peu stable) est obtenu et ce dernier pourrait subir une oxydation en dérivé sulfonamide plus stable (Schéma 25).¹³⁸

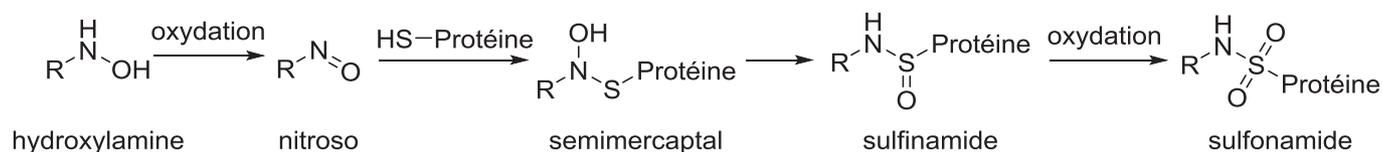


Schéma 25 : Liaison d'un dérivé sous forme hydroxylamine à une protéine puis oxydation du dérivé sulfinamide en dérivé sulfonamide

Dans l'étude de Peng et Turesky, la HSA (préalablement traitée pour libérer la cystéine 34 sous sa forme –SH) est incubée avec le dérivé hydroxylamine (dissout dans un peu d'éthanol) dans un tampon phosphate à pH 7,4 à 37°C pendant 18h. L'oxydation de ce bioconjugué est ensuite réalisée avec du *m*-CPBA (1:50), puis la digestion est effectuée par la trypsine et la chymotrypsine. La chymotrypsine est une enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques d'une protéine en C-terminal de chaque résidu tyrosine, tryptophane, phénylalanine et leucine de la séquence. Un peptide hapténisé est alors observé, contenant la cystéine 34 sur lequel la phénylalanine 36, proche du site d'hapténisation, n'a pas subi l'action de la chymotrypsine. Grâce à cette oxydation, Peng et Turesky sont en mesure d'observer l'adduit sulfonamide stable après digestion alors que le sulfinamide est clivé, l'accroche de leur dérivé sur la HSA est estimée comme étant supérieure à 95%.^{138,163}

b) Conclusion

Après l'analyse de toutes ces études il a été constaté que la HSA est la protéine standard utilisée pour ce genre d'étude. De plus la synthèse de bioconjugués *in vitro* n'est pas un handicap par rapport aux études *in vivo*, et a même l'avantage d'être plus simple à mettre en œuvre.^{101,102} Au fur et à mesure du temps, la précision des outils d'analyse de spectrométrie de masse a su prouver son efficacité et reste une méthode de choix pour détecter les acides aminés hapténisés par les antibiotiques étudiés. Pour la pénicilline G (**7**), la dernière étude en date est celle de Meng et ses collaborateurs. Des séra de patients sont utilisés ce qui permet une comparaison avec des études menées *in vitro*.¹⁰³ De même pour l'amoxicilline (**4**), il a été démontré qu'en tant que β-lactame, les mêmes acides aminés que pour la pénicilline G (**7**) sont hapténisés. La différence résidant dans sa capacité à hapténiser la HSA qui est plus faible que celle de la pénicilline G (**7**), ce qui n'empêche pas une comparaison avec les travaux précédents de Meng,¹⁰³ ainsi que ceux d'Ariza qui a également réalisé une étude fondamentale.¹²⁹

Pour le SMX (**5**), l'étude de Peng ne traite pas de cet antibiotique mais de molécules similaires, ce qui permet de considérer cette approche comme pouvant être appliquée au SMX (**5**). Elle est plus pertinente que la publication de Callan sur le SMX (**5**) car elle permet d'obtenir un dérivé sulfonamide, plus adéquat grâce à la grande stabilité, de l'adduit formé. De plus les concentrations plus élevées de protéine hapténisée obtenues permettront d'avoir un seuil de détection plus élevé.¹⁶³ Au niveau de la formation des bioconjugués la méthode de Peng et Turesky effectue l'incubation avec du SMX-HA (**53**) plutôt que du SMX-NO (**54**) qui est moins stable en solution.¹⁶¹ Cette méthode permet donc d'obtenir de meilleurs rendements de formation de bioconjugués.

L'acide aminé hapténisé par le principe actif est l'élément déclencheur de la réaction immunitaire. Seulement il doit être lié à une séquence peptidique reconnue comme épitope pour être présenté au TcR des lymphocytes T.

2) Prédiction des peptides potentiellement immunogènes : les épitopes

Les critères à prendre en compte pour la sélection des épitopes sont (Schéma 26) :

- La bonne accroche du peptide aux CMH de classe II : les HLA-D (DR, DP ou DQ).
- La bonne orientation de l'antibiotique sur le peptide pour être dirigé vers le TcR.

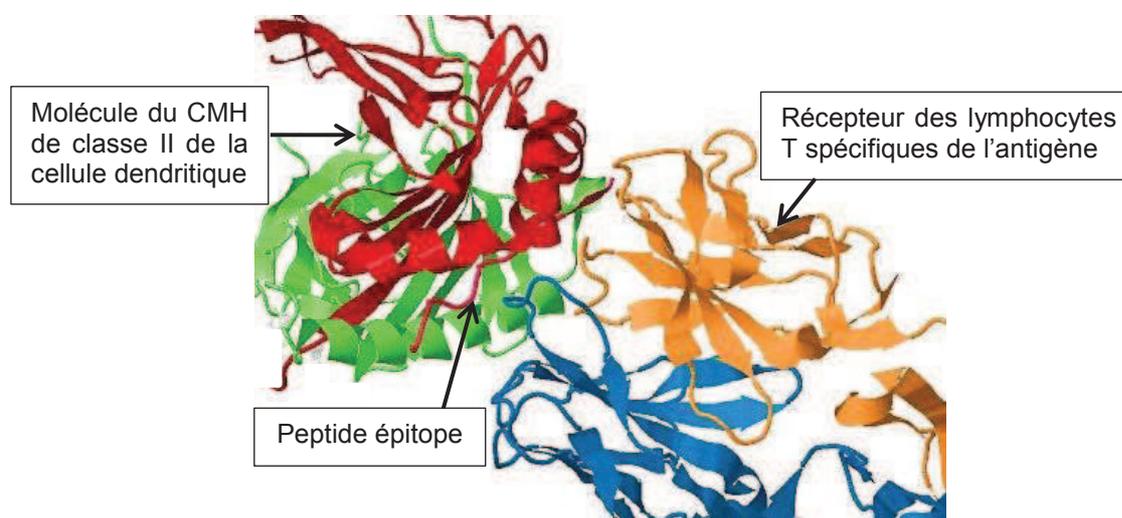


Schéma 26 : Représentation générale d'un épitope (en rose) lié au niveau d'un HLA d'une cellule dendritique (en rouge et vert) et présenté à un lymphocyte T via son TcR (en bleu et orange) (PDB : 1J8H)¹⁶⁴

Pour étudier la bonne accroche entre le peptide et les HLA-D, un choix doit être réalisé parmi les différents allèles de HLA-D présents dans le monde. Le fait que les gènes codant pour les molécules des HLA aient différents allèles s'appelle le polymorphisme, le HLA est dit polygénique.^{15,16} Le polymorphisme des gènes du HLA-D étant très important, et d'autant plus important pour le HLA-DRB1,¹⁵ c'est donc au niveau de ce gène que se trouve la plus grande diversité entre les populations.

D'après la nomenclature des CMH le « D » signifie classe II, le « R » représente la famille de l'allèle, le « B » signifie que ce gène code pour la chaîne β du HLA et le 1 permet de différencier ce gène des autres HLA-DRB existants. Les nombres qui suivent correspondent à leur différenciation par leur séquence, et donc à l'allèle impliqué.^{15,16,165} Dans cette étude nous nous intéressons aux allèles du HLA-DRB1 les plus représentés (c'est-à-dire ceux présentant une fréquence supérieure à 5%) dans la population caucasienne, et plus précisément ceux des populations française, martiniquaise et tunisienne. Les fréquences en % sont listées dans le Tableau 4 ci-après. La population martiniquaise est spécifiée comme étant un croisement entre la population européenne et la population africaine,¹⁶⁶ de même pour la population tunisienne. Aussi, les gènes des HLA caucasiens sont retrouvés dans ces deux populations.^{15,16}

Etude \ Allèle DRB1	0101	0301	0401	0701	1101	1301	1501	N	Année
1 ¹⁶⁷	9,3	10,9	5,6	14,8	9,2	6,0	8,0	158	1993
2 ¹⁶⁸	12,6	11,6	19,6	15,3	-	9,6	18,3	150	1995
3 ¹⁶⁹	7,0	15,2	10,0	12,3	6,8	7,8	13,3	200	1995
4 ¹⁶⁶	7,0	15,0	11,0	12,0	7,0	8,0	13,0	200	2000
5 ¹⁷⁰	10,5	10,9	12,5	14,6	14,3	13,1	10,3	4 640	2013
Moyenne pondérée	10,3	11,2	12,3	14,4	13,6	12,4	10,7		
classement	7	5	4	1	2	3	6		

Tableau 4 : Fréquences en % des allèles les plus représentés dans la population caucasienne en fonction de l'étude et moyennes des fréquences pondérées par l'effectif de chaque étude (source <http://www.allelefrequencies.net>¹⁷¹ consulté en mars 2015)

D'après le Tableau 4, sept allèles ont une fréquence de représentation de plus de 5% dans la population caucasienne (sauf pour l'étude 2 où l'allèle HLA-DRB1*1101 a une fréquence de 4,3% et ne fait donc pas partie des allèles les plus représentés). Ils ont des fréquences différentes en fonction de l'étude réalisée mais ces 7 allèles sont toujours les plus représentés. Une moyenne pondérée a été calculée en fonction de l'effectif à partir duquel l'étude s'est basée permettant de classer ces 7 allèles selon leur fréquence moyenne. Ce classement servira de base pour notre étude.

Pour rappel, les CMH permettent de présenter des peptides aux récepteurs des lymphocytes T. Ce sont des protéines qui sont donc arrangées de telle sorte qu'elles forment une poche (appelée poche d'ancrage) dans laquelle sont placés les peptides.^{15,16} Le CMH de classe II a une poche d'ancrage dite ouverte, les peptides qu'il présente ont des longueurs comprises entre 12 et 25 acides aminés. Par contre, de par ses extrémités ouvertes, les peptides vont dépasser et il n'y aura que 9 acides aminés qui seront réellement en contact avec la poche d'ancrage, les autres sont dits dans la zone flanquante (Figure 11).^{172,173}

Expérimentalement, il est observé que les peptides se placent dans la poche d'ancrage des CMH de telle sorte que leur extrémité *N*-terminale soit la plus proche de l'extrémité *N*-terminale du CMH, représentée en rouge sur la Figure 11 ci-dessous.¹⁷⁴

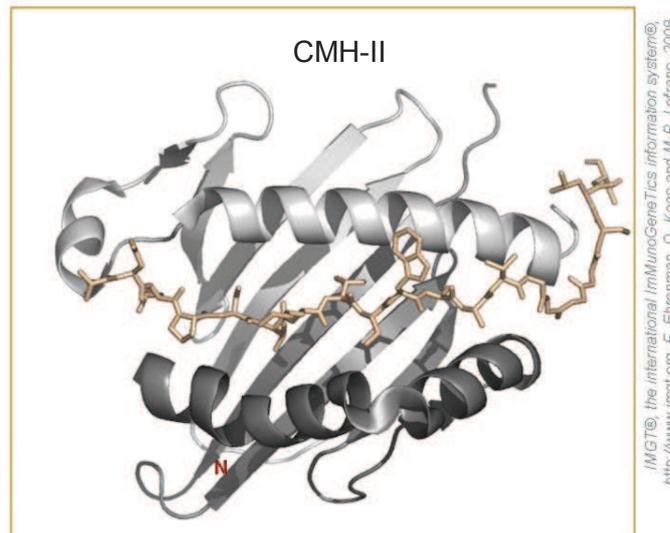


Figure 11 : Représentation d'un peptide dans la poche d'ancrage du CMH de classe II. Le *N* rouge représente la partie *N*-terminale de la protéine HLA vers laquelle s'oriente le *N*-terminal du peptide. IMGT/3Dstructure-DB et PDB : 1J8H¹⁶⁴

Il a déjà été prouvé que la longueur du peptide est importante et joue sur la stabilité du complexe peptide-HLA-D.¹⁷⁵ Les peptides les plus courts sont donc préconisés. Sachant que les peptides doivent comprendre entre 12 et 25 acides aminés, de nombreuses études se basent sur des peptides d'une longueur moyenne de 15 acides aminés.^{176–178} De plus une étude a déjà montré que les peptides épitopes liés aux CMH de classe II font en moyenne 15-mers de long.¹⁷⁹ Les peptides considérés pour cette étude seront donc de 15-mers.

La nature du peptide sera dépendante de la séquence de la protéine porteuse aux abords de l'acide aminé hapténisé. L'interaction entre un peptide et une poche HLA-D peut être simulée *in silico* à l'aide de logiciels tels que l'IEDB (immune epitope database),^{180–182} SYFPEITHI,¹⁸³ MHCBN (major histocompatibility complex binding and non-binding peptides)¹⁸⁴ ou AntiJen.¹⁸⁵ Les deux premiers sont les principaux outils utilisés, les deux derniers étant des bases de données plus petites. En novembre 2009, la banque de données SYFPEITHI contenait 1 623 épitopes pour les HLA de classe II sur 47 allèles différents de HLA-DR, -DP et -DQ. En comparaison, à la même date, l'IEDB disposait de 15 556 mesures de probabilité d'accroche entre un épitope et un HLA de classe II sur 31 allèles HLA-DR entièrement caractérisés, et quelques allèles HLA-DQ. Un mois plus tard l'IEDB détaillait environ 36 000 interactions peptide-CMH de classe II.¹⁸⁶ Cette base de données étant la plus complète, ce travail de thèse a donc été réalisé avec l'IEDB : MHC-II binding predictions (tools.immuneepitope.org/mhcii/).^{187–191}

Ce logiciel calcule donc la probabilité d'accroche d'un peptide simple (sans modification apportée par l'antibiotique) avec un allèle de HLA de classe II, parmi un large choix de sous-types d'allèles. Pour chaque probabilité d'accroche calculée, le logiciel fournit les 9 acides aminés du peptide épitope impliqués dans la liaison avec la poche du HLA. Il nous sera alors possible de déterminer l'orientation de la chaîne latérale de chaque acide aminé du peptide. En effet, tout peptide s'oriente de la même manière dans la poche du HLA. Pour les acides aminés du peptide en position 1, 4, 6, 7 et 9 (en rouge sur la Figure 12), la chaîne latérale est dirigée en direction du HLA, alors que pour les acides aminés du peptide en position 2, 3, 5, 8 et -1 (position juste après le premier acide aminé du site d'ancrage, en vert sur la Figure 12) la chaîne latérale est en direction de l'extérieur de la poche du HLA donc en direction du récepteur du lymphocyte T (Figure 12).¹⁷⁴

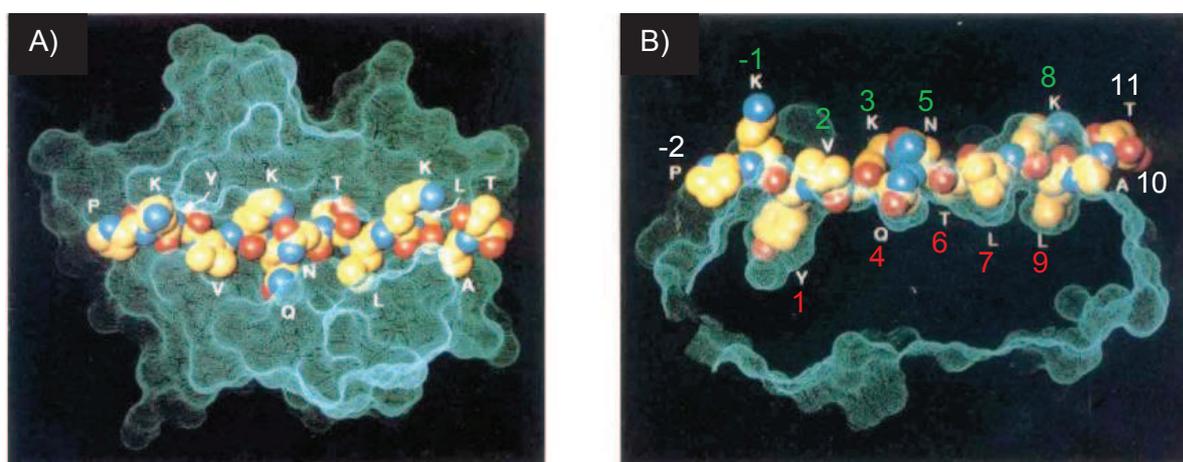


Figure 12 : Représentation du peptide PKYVKQNTLKLAT dans la poche du HLA-DR1 (HLA-DRA et HLA-DRB1*0101) d'après une publication de Stern.¹⁷⁴ Vu du dessus (A) et sur le côté (B). La surface de la protéine HLA est représentée en bleu transparent, le peptide est représenté sans ses hydrogènes, les boules jaunes représentent des atomes de carbone, les bleues des atomes d'azote et les rouges des atomes d'oxygène. Les positions de chaque acide aminé du peptide dans la poche HLA sont numérotées (de la position N-terminale à la C-terminale du peptide) avec, en rouge les positions qui orientent les acides aminés vers le HLA, en vert celles qui les orientent vers le TcR et en blanc les acides aminés en zone flanquante

Parmi toutes les méthodes de calculs proposées par le logiciel IEDB, la méthode du consensus est celle conseillée puisqu'elle combine plusieurs modes de calcul, et permet une meilleure performance globale du logiciel.¹⁹⁰ Par contre, peu de méthodes prennent en compte la zone flanquante et la longueur d'un peptide dans leurs calculs.¹⁹² La méthode nommée NN-align du logiciel IEDB est la seule méthode qui prend en compte les résidus de la zone flanquante ainsi que la longueur du peptide, ce qui améliore significativement la prédiction.^{186,193} Les peptides considérés pour cette étude étant d'une longueur de 15 acides aminés et la poche HLA ne pouvant en contenir que 9, il y aura 6 acides aminés du peptide en zone flanquante dont l'influence sur l'interaction sera prise en compte dans la méthode NN-align du logiciel IEDB.

Une autre méthode pour choisir des peptides positionnés dans une poche d'ancrage de HLA est la méthode par criblage virtuel.¹⁹⁴ Le logiciel VMD (visual molecular dynamics) est un logiciel de visualisation de dynamique moléculaire.¹⁹⁵ Des peptides peuvent être simulés dans des poches de HLA *in silico* et placés dans un milieu aqueux par ce logiciel (avec TIP3P, un des meilleurs modèle d'eau pour une simulation de dynamique moléculaire).¹⁹⁶ Une extension parallèle de VMD est NAMD (nanoscale molecular dynamics), un programme de calcul de dynamique moléculaire qui simule l'évolution du mouvement d'une protéine en phase aqueuse, soumise à champ de force, au cours du temps. Le logiciel VMD est capable, à partir des calculs de NAMD, de traiter ces informations en visualisation, il va alors analyser les données de trajectoire dynamique qui peuvent être combinées sur un graphique de RMSD-2D (root mean square deviation). La RMSD-2D permet de comparer entre elles les différentes conformations d'une protéine obtenues lors d'une dynamique moléculaire. Sur l'axe des abscisses (comme sur celui des ordonnées) sont retrouvées les différentes conformations qu'a prises la protéine au cours de la dynamique moléculaire.

Dans l'exemple présenté en Figure 13 ci-après, issu d'une publication de Bouard *et al.*, des modélisations de dynamique moléculaire ont été effectuées sur un complexe entre l'hétérodimère des transcriptases TWIST1 et E12 et un double brin d'ADN. 100 Conformations du complexe ont été sélectionnées uniformément parmi les 1 000 générées au cours des 6,1ns de dynamique moléculaire.¹⁹⁷ L'écart quadratique moyen de la distance interatomique (en Å) entre deux conformères est présenté suivant une échelle de couleur. La diagonale du graphique présente un écart quadratique de 0 Å, puisqu'elle compare les deux mêmes conformations. Autour de la diagonale, des cadres se dessinent, représentant des conformères différant d'un faible écart quadratique. Ces cadres forment alors une famille stable de conformères qui peut être représentée par une seule structure. Par exemple, dans la Figure 13 ci-après, trois familles avec un écart quadratique maximum de 1,6 Å sont sélectionnées : les conformations 18, 47 et 81 représentent respectivement la première, deuxième et troisième famille de conformères.¹⁹⁷

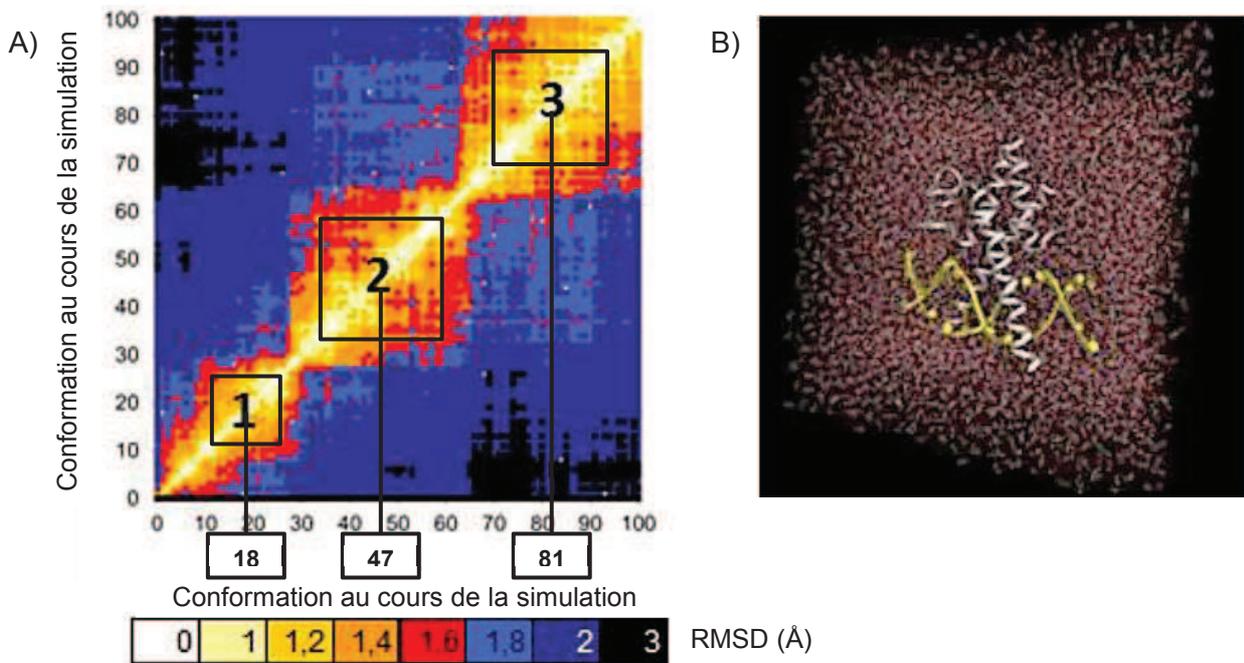


Figure 13 : Exemple de calculs de RMSD tracés en deux dimensions (RMSD-2D) sur 100 conformations sélectionnées parmi 1 000 produites (A) durant une simulation de dynamique moléculaire de 6,1ns réalisée sur le complexe protéine-ADN (respectivement représentés en blanc et jaune) dans une boîte d'eau TIP3P (B) d'après une publication de Bouard *et al.*¹⁹⁷

Travailler sur un seul conformère représentant une famille permet de réduire considérablement le nombre et donc le temps d'analyse. Une fois les conformères représentants sélectionnés, la stabilité de ces complexes peut être déterminée par la méthode de l'« alanine scanning ».^{198,199} Cette méthode consiste en la mutation en alanine des acides aminés en interaction dans un récepteur. L'alanine est un acide aminé simple ayant pour seule chaîne latérale un méthyle. De par sa simplicité, changer les acides aminés d'un peptide en interaction dans une poche HLA par des alanines permet d'évaluer la contribution énergétique de chaque acide aminé – en positif ou en négatif – vis-à-vis des interactions avec la poche. Pour cela, le logiciel Rosetta est utilisé, il permet de calculer la variation de la variation de l'énergie libre d'interaction ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) de chaque acide aminé du peptide par rapport à s'il est muté en alanine.²⁰⁰ Le $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ est égal à la différence entre la variation d'énergie libre d'interaction de la protéine dite « wild-type » (WT), donc sans modification ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{WT}}$) et la variation d'énergie libre d'interaction de la protéine ayant subi la mutation en alanine d'un de ses acides aminés ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MUT}}$).¹⁹⁸ Si un complexe HLA-peptide exprime une variation de la variation d'énergie libre négative alors cela signifie que son énergie libre est plus basse lorsque les acides aminés du peptide ne sont pas des alanines ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{WT}} < \Delta G_{\text{bind}}^{\text{MUT}}$), leur contribution est donc nécessaire à une bonne fixation dans la poche HLA. Si au contraire le $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ est positif alors l'énergie libre du complexe muté est plus basse que celle du non-muté ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MUT}} < \Delta G_{\text{bind}}^{\text{WT}}$) et donc favorable si les acides aminés sont des alanines, ce qui signifie que les acides aminés du peptide gênent sa bonne accroche dans la poche. Chaque complexe HLA-peptide peut donc être évalué de la sorte pour permettre une sélection des meilleurs peptides.

La méthode de la dynamique moléculaire est efficace et fiable mais très longue à mettre en œuvre. Combiner plusieurs techniques de modélisation *in silico* peut s'avérer être une bonne méthode pour additionner les avantages de chaque technique et éviter les écueils des approximations des méthodes de modélisation.

Après ces deux premières étapes de sélection *in silico* des peptides, il nous faudra valider expérimentalement l'immunogénicité de ces peptides. Aussi, plusieurs stratégies de synthèse sont alors envisagées.

3) Méthode de synthèse des épitopes à disposition

a) Etat de l'art

Pour synthétiser les peptides plusieurs possibilités sont envisageables :

- Synthétiser les peptides sans l'antibiotique puis l'ajouter en se plaçant dans les mêmes conditions que pour la synthèse des bioconjugués : des conditions physiologiques.
 - Synthétiser les peptides protégés orthogonalement puis couper l'antibiotique après déprotection sélective.
 - Synthétiser un monomère acide aminé-antibiotique et construire les peptides sur support solide en considérant le monomère comme un acide aminé classique.
-
- Synthèse des peptides puis ajout de l'antibiotique

Cette méthode a été mise en œuvre en 2009 par l'équipe de Park et Naisbitt avec le SMX (**5**) mais également avec la *para*-phénylènediamine (**59**), composant de teintures et colorants induisant des réactions allergiques de contact avec la peau, qui se lie aux protéines après une oxydation en 1,4-benzoquinonediimine (**60**) (Schéma 27).^{135,201}

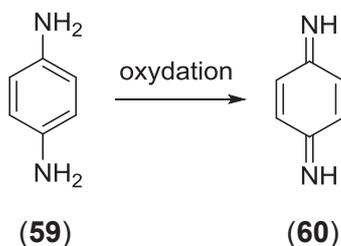


Schéma 27 : Oxydation de la *p*-phénylènediamine (**59**) en 1,4-benzoquinonediimine (**60**)²⁰¹

Ces molécules sont couplées à un peptide non-naturel DS3 suivant un ratio molaire de 10:1. Ce peptide est composé de chacun des acides aminés naturels dans cet ordre : VLSPADKTNWGHEYRMFCQIG. Le couplage est réalisé dans le noir (le peptide DS3 est photolabile) et à température ambiante pendant 24h ; soit dans un mélange acétonitrile/acétate d'ammonium (50 mM, 25:75 v/v) pour l'étude sur le *para*-phénylènediamine (**59**) soit dans un tampon phosphate à pH = 7,4 pour l'étude sur le SMX (**5**).²⁰¹ Le peptide DS3 présente chacun des acides aminés naturels. Son utilisation ne mime pas le vivant mais sert d'orientation en vue d'une étude sur le ou les acides aminés hapténisés par la molécule d'intérêt. Cette méthode est sélective si la molécule ne modifie qu'un seul type d'acide aminé (comme le SMX (**5**)). Par contre la sélectivité est perdue si elle réagit avec plusieurs types d'acides aminés (comme les pénicillines), ou si le peptide contient plusieurs acides aminés de même nature.

Dans l'étude d'Ariza, un couplage entre l'amoxicilline (**4**) et des peptides synthétiques issus de la HSA est effectué : LQQCPF (pour l'étude de la réactivité de la cystéine 34), HPYFYAPELLFFAK (pour l'histidine 146), LKCASLQK (pour la lysine 199) et LVNEVTEF (comme peptide contrôle pour étudier la liaison à l'amine terminale du peptide) dans 10 mM de PBS (tampon phosphate à pH = 7,4 avec NaCl et KCl en plus) pendant une nuit à 37°C.¹²⁹ Mais, en plus des acides aminés étudiés, ces peptides sont composés d'autres acides aminés nucléophiles. Par exemple, dans le peptide LKCASLQK, c'est la lysine 199 qui est ciblée, mais une autre lysine, une cystéine et une sérine sont également présentes. Le manque de sélectivité de cette méthode est donc mis en évidence, corrélé au choix du peptide épitope visé à la synthèse. De plus, s'ajoute au manque de sélectivité un défi de séparation des différents co-produits générés.

Dans l'étude de Peng et Turesky, le dérivé nitroso est incubé avec un peptide synthétique issu de la HSA contenant la cystéine 34 : LQQCPF.²⁰² Les peptides hapténisés sont ensuite oxydés sous forme de sulfonamide avec du *m*-CPBA dans 0,1 M de tampon phosphate à pH = 7,4 à température ambiante pendant 1h.¹⁶³ Le SMX (**5**) étant spécifique des cystéines, et le peptide d'intérêt n'en possédant qu'une seule la sélectivité est respectée. Mais cette technique limite l'épitope à ne contenir qu'une seule cystéine.

En 2013, un brevet a été déposé par Boto Castro et ses collaborateurs, qui réalisent des modifications de peptides sur plusieurs types d'acides aminés, entre autre des sérines (**61**). En premier lieu un clivage par une oxydation radicalaire conduit à un intermédiaire iminium (**62**) en équilibre avec un intermédiaire acétoxyglycine (**63**) (par l'action de tétraacétate de plomb ou de (diacétoxyiodo)benzène en présence de diode sous irradiation de lumière visible). La présence d'un acide de Lewis (comme le trifluorure de bore étherate) permet de tirer l'équilibre vers la forme iminium (**62**) puis l'addition d'un nucléophile conduit au peptide modifié (**64**) (Schéma 28).²⁰³

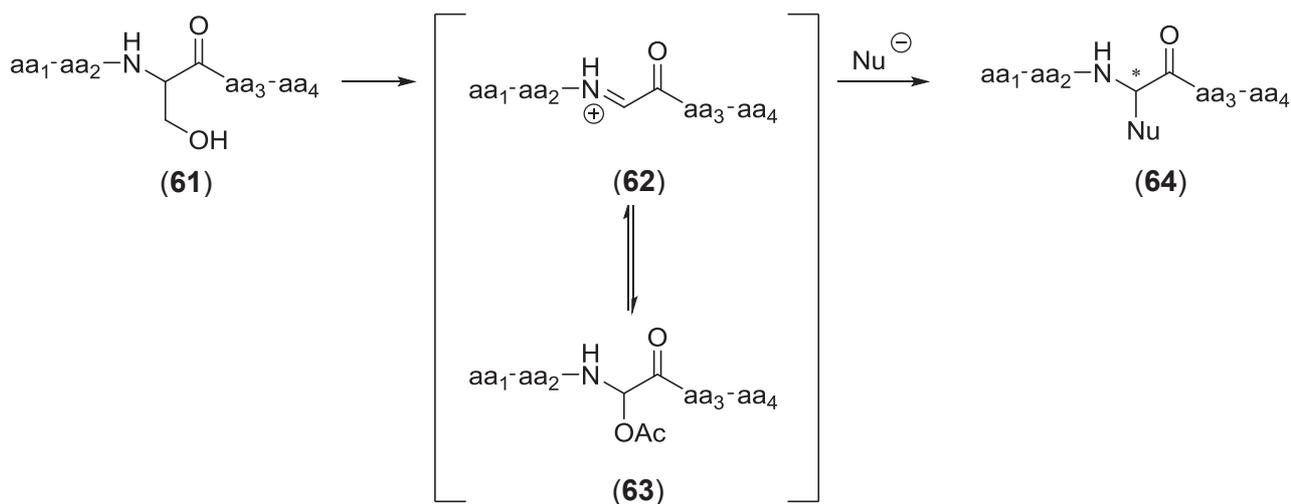


Schéma 28 : Modification de sérines par la méthode de Boto Castro *et al.*²⁰³

Les inconvénients sont rapidement décelables : le peptide modifié (64) n'est pas énantiomériquement pur. De plus la notion de sélectivité est impossible à garantir si les acides aminés notés aa₁ à aa₄ sont également des sérines.

De même, dans une publication de Hennrich *et al.* de 2009, les auteurs décrivent une modification de peptides contenant des lysines *N*-terminales. Dans une première partie, les dérivés amines primaires des peptides (65) sont modifiés par exemple par acylation avec l'ester de *N*-hydroxysuccinimide nicotine (66) ou par amination réductrice impliquant du formaldéhyde pour obtenir des peptides possédant des lysines modifiées en position α- et ε-aminée (67) et (68) (Schéma 29).²⁰⁴

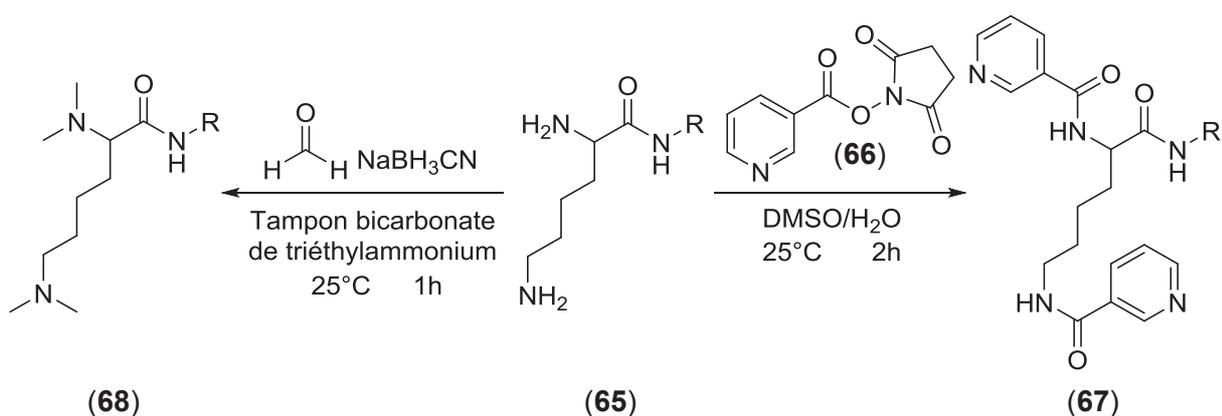


Schéma 29 : Modification des dérivés lysines en position α- et ε-aminée d'après Hennrich *et al.*²⁰⁴

Alternativement, des modifications sélectives de ϵ -amino lysines ont été réalisées par guanidination avec la *O*-méthylisourée (**69**) ou imidazolinylation avec le 2-méthoxy-4,5-dihydro-1*H*-imidazole (**70**) et un peptide contenant une lysine *N*-terminale (**65**). Les deux peptides ont été modifiés uniquement au niveau de l'amine de la chaîne latérale de la lysine (**71**) et (**72**) (Schéma 30).²⁰⁴

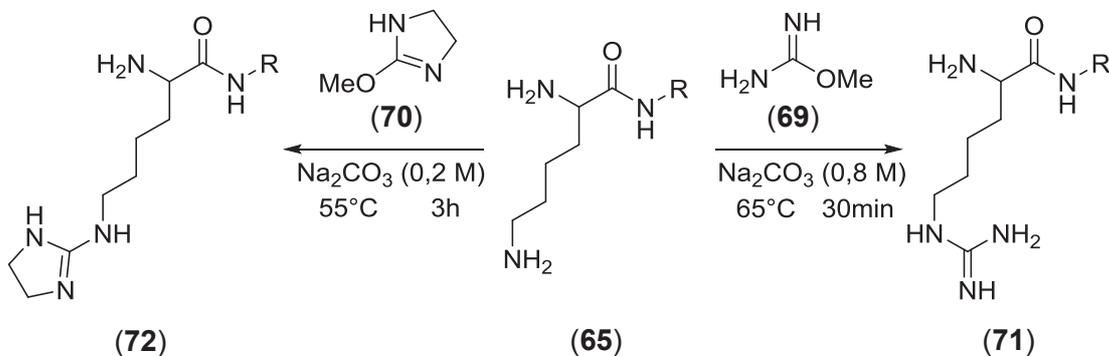


Schéma 30 : Modifications spécifiques des ϵ -amino des lysines sur des peptides avec une lysine *N*-terminale (65**) d'après la méthode de Hennrich *et al.*²⁰⁴**

Cette méthode permet de modifier sélectivement l'extrémité ϵ -aminée des lysines par rapport à l'amine *N*²-terminale d'un peptide seulement il n'y a pas de sélectivité au niveau des autres lysines du peptide.

Une publication de Wiktorowicz *et al.* de 2012 rapporte les modifications, sur des peptides de 8 acides aminés de long, découlant de l'utilisation du réactif iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation). Ce composé est utilisé dans le but d'effectuer des modifications de type *N*-acétylations sur les amines primaires des peptides.²⁰⁵ Cependant, des *O*-acétylations sur les sérines et les tyrosines sont également recensées (Schéma 31).²⁰⁶ Ce dernier exemple pointe une fois de plus le fait que certaines conditions et certains réactifs peuvent également réagir avec d'autres dérivés nucléophiles que ceux souhaités.

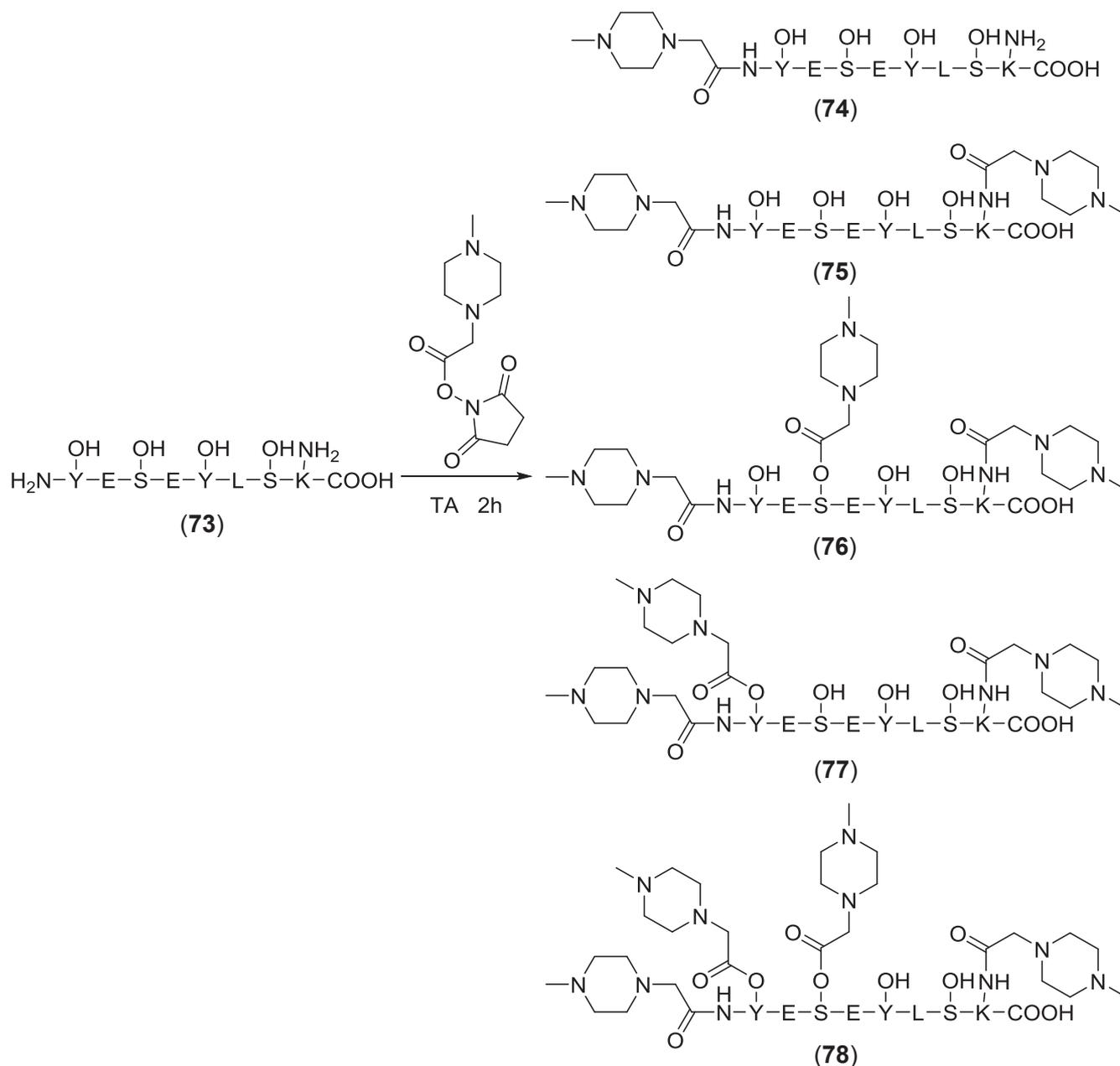


Schéma 31 : Action du réactif iTRAQ sur un peptide (73) menant à un mélange de produits souhaités (74) et (75) et secondaires (76), (77) et (78)²⁰⁶

En conclusion, lorsqu'une modification est effectuée directement sur un peptide, le manque de sélectivité est la principale contrainte. Les peptides synthétisables par cette méthode se restreignent à ceux ne possédant pour seul nucléophile que celui visé par la modification. Cette condition limite donc le choix des épitopes. Une alternative consiste en des protections/déprotections des résidus nucléophiles non visés.

- Synthèse des peptides modifiés par protections/déprotections orthogonales

La deuxième méthode connue pour obtenir des peptides modifiés repose sur des protections/déprotections orthogonales des acides aminés réactifs. Par exemple, pour effectuer des modifications sur plusieurs sérines de manière sélective, Boto Castro et ses collaborateurs emploient un groupement protecteur des sérines noté GP. La modification par R_1 comme décrite précédemment (cf. Schéma 28 p.75) est effectuée sur la sérine non protégée du peptide (79). La déprotection sélective du peptide mono-modifié (80) offre une sérine libre qui peut alors subir une deuxième modification avec le nucléophile R_2 , conduisant au peptide di-modifié (81) (Schéma 32).²⁰³

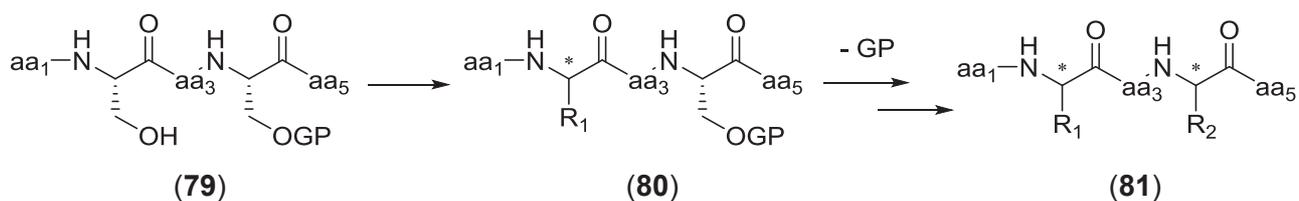


Schéma 32 : Modification de deux sérines d'un peptide (79) par protections/déprotections orthogonales²⁰³

Comme le montre cet exemple, cette technique est très efficace. Seulement, la préparation du peptide doit être directement effectuée avec des acides aminés protégés de manière orthogonale ce qui requiert un choix judicieux et adaptable à chaque peptide des groupements protecteurs, impliquant une augmentation du nombre d'étape de synthèse du peptide hapténisé.

Un autre exemple est celui d'Edwards et ses collaborateurs, qui publient en 2013 la synthèse du couplage entre un peptide et des nanocristaux de cellulose. Le couplage est effectué par le biais d'une amidation réalisée à l'aide de la *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) entre un acide carboxylique greffé sur la partie *N*-terminale du peptide (82) et un dérivé amino du nanocristal (83). L'autre acide carboxylique en *C*-terminal du peptide (82) étant protégé sous la forme d'un amide par la *para*-nitroaniline (84). Le produit de couplage (85) est ensuite déprotégé par hydrolyse enzymatique avec l'élastase des neutrophiles humains, qui reconnaît ce motif peptidique, pour accéder au produit convoité (86) (Schéma 33).²⁰⁷

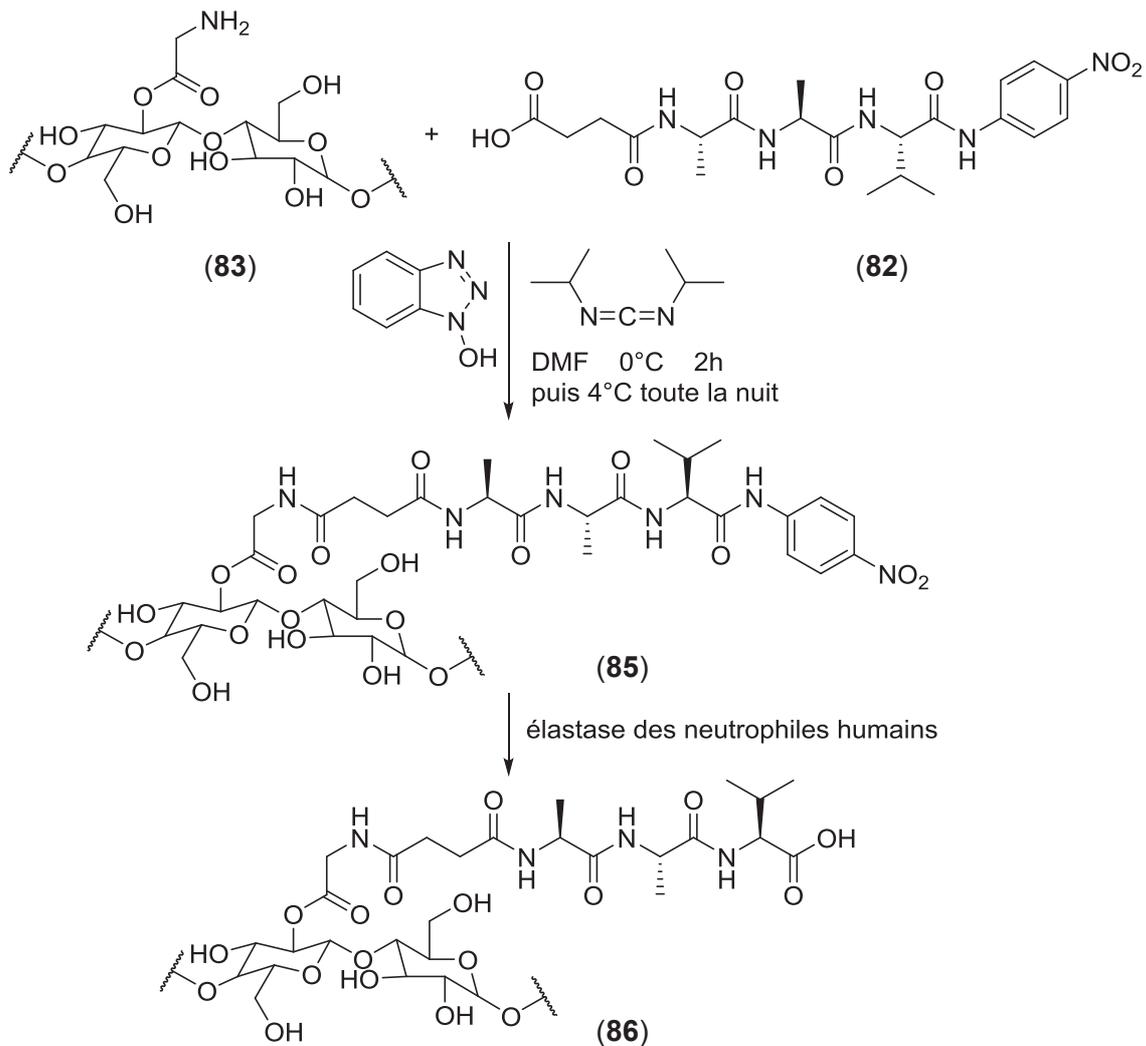


Schéma 33 : Modification d'un peptide (82) par des nanocristaux de cellulose (83)²⁰⁷

L'utilisation des enzymes permet une excellente sélectivité. Seulement le peptide doit posséder le motif reconnu par le site actif de l'enzyme. Ce qui restreint le choix des peptides épitopes. Ou alors une autre enzyme doit être utilisée en fonction du peptide choisi ce qui oblige à mettre au point de nouvelles conditions pour chaque peptide.

En conclusion cette méthode peut s'avérer efficace pour une synthèse de peptides courts (moins de 10 acides aminés de long) avec peu de groupements nucléophiles mais elle reste néanmoins contraignante, chère et longue à mettre en œuvre. En particulier pour des longs peptides comportant un grand nombre d'acides aminés nucléophiles comme ceux visés pour ce projet. Une méthodologie plus accessible lors de la synthèse d'un grand nombre de peptides différents contenant un même acide aminé modifié doit donc être prospectée.

- Synthèse d'un monomère à intégrer dans une synthèse peptidique classique

Cette troisième méthode consiste en la synthèse d'un acide aminé modifié sur sa chaîne latérale par la molécule désirée, et protégé des côtés *N*- et *C*-terminaux par des groupements protecteurs peu coûteux, et classiquement utilisés en synthèse peptidique. Si le motif introduit comporte des groupements réactifs, ils doivent être protégés par des groupements sensibles aux mêmes conditions que le clivage final du peptide de la résine. Ceci permet de retrouver le peptide avec sa modification sur le bon acide aminé à la fin de la synthèse peptidique.

Par exemple dans le brevet, ainsi que la publication de Boto Castro et ses collaborateurs, la modification sur une sérine est directement réalisée sur la Bz-Ser-OMe (**87**) par la même méthode que celle décrite précédemment : utilisant l'intermédiaire iminium (**88**). L'acide aminé, protégé par des groupements simples, est modifié par le 2-bromoanisole pour conduire à l'acide aminé non naturel (**89**) (Schéma 34).^{203,208}

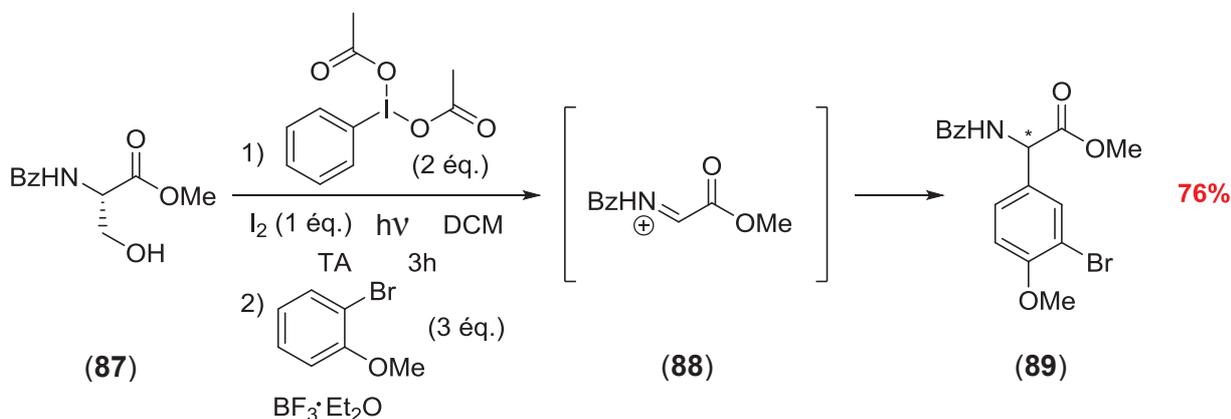


Schéma 34 : Synthèse d'un acide aminé modifié (89) par la méthode de Boto Castro *et al.*²⁰³

b) Conclusion

Autour de cet état de l'art il est possible de distinguer les avantages et les inconvénients de chacune des trois méthodes à disposition pour préparer un peptide sélectivement modifié sur un acide aminé par un principe actif ou l'un de ses métabolites. La première méthode d'incubation directe d'un peptide présente un manque de sélectivité dès qu'un autre résidu nucléophile que celui visé par la modification est présent sur le peptide épitope que l'on souhaite synthétiser. De plus, la génération de produits secondaires, même minime, oblige l'optimisation d'une étape de purification.

La deuxième méthode se distingue par la protection orthogonale des groupements nucléophiles présents sur le peptide. Néanmoins un jeu de protections et de déprotections sélectives devra être mis en place. Cette technique est efficace, mais ces étapes doivent bien être anticipées et prendre en compte la fragilité de la liaison formée lors du couplage de l'haptène avec le peptide. De plus chacun des peptides épitopes sélectionnés étant différent, ils nécessiteront une nouvelle optimisation de leur voie de synthèse. Etant donné les rendements lors d'une synthèse d'un peptide

d'une longueur importante, impliquant un grand nombre d'étapes de protections et déprotections, utiliser des acides aminés classiques reste la solution la moins onéreuse. Le prix de ces acides aminés protégés tenant compte de la facilité de déprotection ainsi que de l'originalité du caractère orthogonal nécessaire pour une synthèse d'un peptide de plus de 10 acides aminés de long.

Ainsi l'attractivité de la troisième méthode impliquant la synthèse d'un monomère acide aminé hapténisé est démontrée. L'exemple de Boto Castro, montre qu'un acide aminé protégé par des groupements simples et peu onéreux, peut être modifié sélectivement. L'acide aminé modifié peut ensuite être utilisé dans une synthèse peptidique avec des acides aminés classiques. Cette méthode a l'avantage d'être plus flexible, sélective et économe, mais il faut tout de même que le monomère soit suffisamment robuste pour résister aux conditions de synthèse peptidique.

Notre but va donc être de synthétiser un monomère acide aminé modifié par l'antibiotique. Ce dernier sera utilisé pour les synthèses de tous les peptides sélectionnés pour l'étude de cet antibiotique, comme un acide aminé classique, après avoir préalablement protégé orthogonalement toutes les fonctions réactives de l'antibiotique. La technique de la synthèse peptidique sur support solide peut être réalisée suivant deux stratégies différentes nommées Fmoc et Boc. Ces noms découlent du groupement protecteur utilisé en position *N*-terminale : le 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) ou le *tert*-butyloxycarbonyle (Boc). Ces deux groupements protecteurs se distinguent par leurs conditions de déprotection : respectivement basique et acide. Lors d'une synthèse peptidique sur support solide, le peptide est construit de la partie *C*-terminale vers la *N*-terminale. La partie *C*-terminale est donc couplée orthogonalement à un polymère fonctionnalisé (résine). En fin de synthèse le peptide est détaché de la résine dans des conditions acides pour la stratégie Fmoc et par le biais d'un clivage hydrolytique avec le fluorure d'hydrogène pour la stratégie Boc. Le fluorure d'hydrogène est un réactif toxique, de plus son utilisation peut parfois dégrader les peptides, en particulier ceux comportant des acides aminés non-naturels. De nombreuses études relatent de comparaisons des deux stratégies, mettant en avant la stratégie Fmoc et ses conditions plus douces pour séparer le peptide de la résine, menant à des meilleurs rendements et puretés.²⁰⁹⁻²¹¹ C'est donc cette stratégie que nous avons décidé d'utiliser pour la synthèse de nos peptides. Les groupements protecteurs placés sur la chaîne latérale des acides aminés réactifs doivent pouvoir se retirer à la fin de la synthèse, lorsque le peptide est clivé de la résine ; ils doivent donc tous être acido-labiles, y compris ceux protégeant l'antibiotique (Schéma 35).

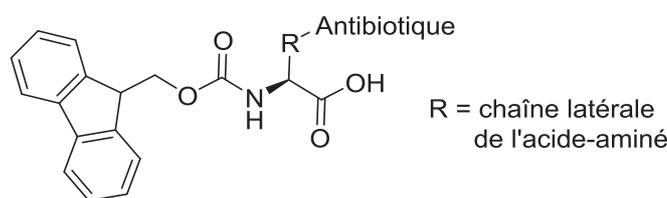


Schéma 35 : Type d'acide aminé synthétisé pour cette étude : FmocHN-aa(antibiotique)-COOH

PRESENTATION DES TRAVAUX

D'après l'étude bibliographique, une stratégie générale pour étudier l'allergie aux antibiotiques a été envisagée. En premier lieu, il s'agit d'identifier sur une protéine modèle du sérum humain, les acides aminés qui seront hapténisés *in vivo* par la molécule étudiée. Nous étudierons donc la synthèse de bioconjugués protéine-antibiotique *in vitro* – dans différentes conditions – qui seront analysés par spectrométrie de masse tandem après digestions trypsiques.

Une fois l'identification des acides aminés hapténisés effectuée, des peptides de 15-mers contenant ces derniers et mimant des épitopes potentiellement issus d'une digestion par une cellule dendritique seront conçus et évalués *in silico*. Nous étudierons non seulement leur accroche vis-à-vis des HLA de classe II pour les 7 allèles les plus fréquents dans la population caucasienne, mais également leur orientation en direction du récepteur du lymphocyte T, pour assurer une meilleure reconnaissance. Les résultats permettront de choisir un ou plusieurs épitopes potentiels pour chaque acide aminé sélectionné.

La dernière étape consistera donc en la synthèse de ses épitopes – en passant par la synthèse d'un monomère acide aminé-antibiotique – avant de pouvoir les tester sur des lymphocytes T issus de patients allergiques ou non.

Le premier chapitre sera consacré aux antibiotiques de type pénicilline : la pénicilline G et l'amoxicilline. Et le second aux sulfamides et plus particulièrement au sulfaméthoxazole.

CHAPITRE I : IDENTIFICATION DE PEPTIDES IMMUNOGENES ISSUS DES PENICILLINES

I. Etude de l'hapténisation de la HSA par les pénicillines, pénicilline G et amoxicilline

Comme vu précédemment (*cf.* Introduction partie II 1) d) p.45 et 2) d) p.55), les pénicillines sont des haptènes. Suite à l'état de l'art sur la formation de bioconjugués *in vivo* au départ de la pénicilline G (**7**) et de l'amoxicilline (**4**), la HSA constituera notre protéine modèle. Pour synthétiser les bioconjugués dans des conditions biomimétiques, la pénicilline G (**7**) et l'amoxicilline (**4**) seront donc incubées avec la protéine d'intérêt directement depuis leurs formes commerciales. D'après la bibliographie, ce sont les lysines qui vont être hapténisées par les pénicillines. En règle générale, les lysines sont connues pour leur faible réactivité à pH physiologique. Cependant, dans la structure tridimensionnelle de la HSA, l'environnement spécifique de chaque lysine peut favoriser sa

déprotonation, son accessibilité, sa réactivité... Ainsi deux lysines spatialement suffisamment proches voient leurs réactivités exacerbées et possèdent un pKa particulièrement bas. Electrostatiquement une lysine pourrait agir sur l'acidité de l'autre de par leur proximité dans la protéine.²¹² Par exemple, la lysine 199 de la HSA a été identifiée avec un pKa de 7,9.^{212,213} Cette dernière est située dans une poche de la HSA dans laquelle les trois lysines 190, 195 et 199 sont connues pour être réactives à pH physiologique.²¹⁴ Néanmoins, Ariza montre que le bioconjugué HSA-AX synthétisé à pH physiologique ne comporte qu'une moyenne de 2 à 4 molécules d'amoxicilline (**4**) liées à la HSA malgré une incubation de la protéine en présence de respectivement 18 ou 91 équivalents d'amoxicilline (**4**), pendant 16h à 37°C.¹²⁹ Aussi, afin d'augmenter la réactivité des lysines sur la HSA, les bioconjugués vont également être synthétisés dans des conditions basiques.

1) Synthèse des bioconjugués HSA-pénicilline (pénicilline G et amoxicilline)

Pour mimer au mieux les conditions physiologiques de bioconjugaison, le mode opératoire décrit par Yvon et ses collaborateurs sera reproduit.¹⁰¹ La HSA dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7,4 est incubée avec 56 équivalents de pénicilline (la HSA comportant 59 lysines, la pénicilline est utilisée en léger défaut par rapport à la HSA) à 37°C pendant une vingtaine d'heures. Pour les conditions basiques, la HSA dans une solution tamponnée à un pH de 10,6 est incubée avec un excès de pénicilline (427 équivalents soit environ 7 équivalents par lysine), à 37°C pendant une vingtaine d'heures.

Pour contrôler que ces conditions physiologiques et basiques ne dégradent pas la protéine, des échantillons de référence sont synthétisés en parallèle des bioconjugués. Pour ce faire, la HSA est placée dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7,4 ou 10,6 sans l'antibiotique. Elle est alors incubée à 37°C pendant une vingtaine d'heures.

Les bioconjugués ainsi préparés sont ensuite diafiltrés pour éliminer l'excès de pénicilline qui n'a pas réagi. L'hapténisation est ensuite contrôlée par western blot avec une révélation par des anticorps anti-pénicilline G (Figure 14). Ces anticorps reconnaissent la pénicilline G (**7**) mais sont également capables de reconnaître les motifs structuraux et fonctionnels issus des β -lactames dont le cycle thiazolidine.¹²⁹ Aussi ces derniers seront utilisés pour la détection des quatre bioconjugués HSA-pénicilline G et -amoxicilline. Néanmoins, comparée à la pénicilline G (**7**), l'amoxicilline (**4**) sera moins révélée par l'anticorps anti-pénicilline G, son seuil de détection vis-à-vis des anticorps anti-pénicilline G étant plus élevé.¹²⁹

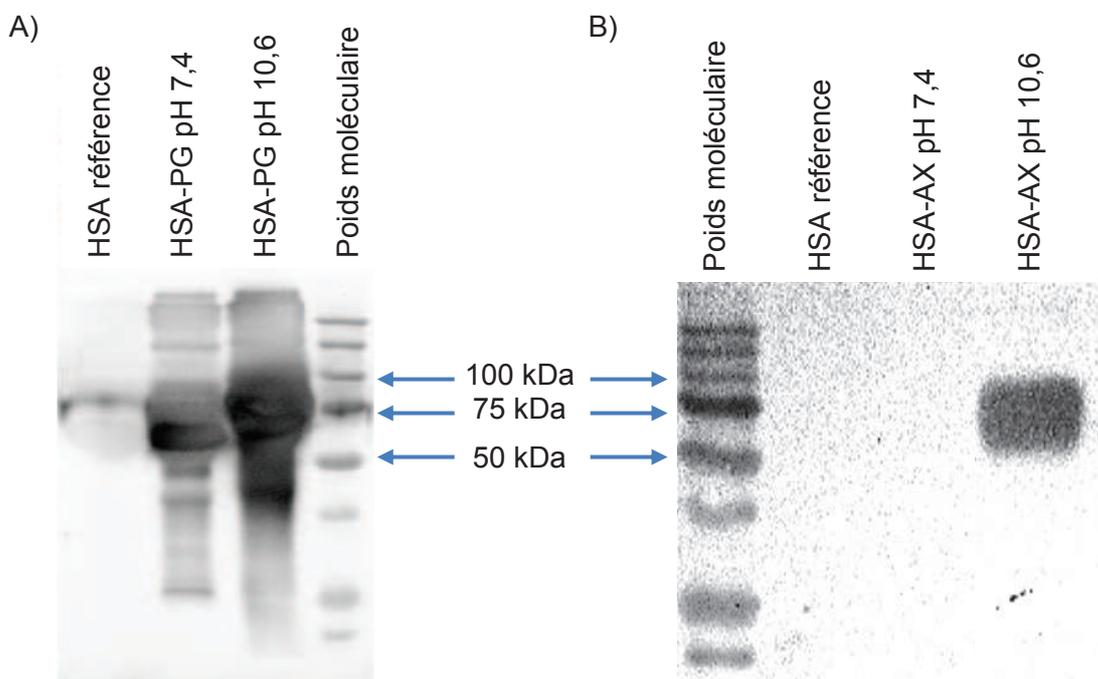


Figure 14 : Western blot des bioconjugués HSA-PG (A) et HSA-AX (B) réalisés à pH 7,4 et 10,6

L'analyse du western blot, présenté en Figure 14, démontre l'hapténisation de la HSA par la pénicilline G (7) après une incubation à pH 7,4 et une à pH 10,6 ainsi que par l'amoxicilline (4) après un couplage réalisé à pH 10,6. En comparant aux HSA de référence, la révélation par les anticorps anti-pénicilline G sur ces bioconjugués confirme la sélectivité de l'anticorps pour les motifs structuraux et fonctionnels issus de la pénicilline G (7) (entre autre le cycle thiazolidine en commun avec l'amoxicilline (4)). On peut noter toutefois que le bioconjugué HSA-AX à pH physiologique n'est pas révéilé. Compte tenu du seuil de détection plus élevé des anticorps anti-pénicilline G vis-à-vis de l'amoxicilline (4), il se pourrait que le faible niveau d'hapténisation de la HSA par l'amoxicilline (4) ne puisse pas être détecté.

L'échelle du poids moléculaire éluee avec les protéines permet également d'observer une différence de masse entre les bioconjugués HSA-PG. A pH physiologique la protéine hapténisée par quelques molécules de pénicilline G (7) révèle un poids moléculaire proche du poids de la HSA non-hapténisée c'est-à-dire autour de 67 kDa. Par contre, le bioconjugué HSA-PG réalisé à pH basique se situe légèrement au-dessus de celui incubé à pH physiologique confirmant qu'une quantité plus importante de pénicilline G (7) s'est fixée sur ce bioconjugué.

2) Spectrométrie de masse sur les bioconjugués

Après cette première observation par western blot, des analyses de masse par MALDI-ToF sur chacun des bioconjugués, comparées à celles des HSA traitées dans les mêmes conditions mais en absence de pénicilline, permet d'évaluer précisément le nombre de pénicillines fixées sur les

bioconjugués HSA-PG et HSA-AX en fonction de leur pH d'incubation. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire « Stallergènes » à Antony (92), et plus particulièrement avec le Dr Emmanuel Nony et le Dr Maxime Le Mignon.

a) Analyse par spectrométrie de masse des bioconjugués HSA-PG

D'après les spectres de masse obtenus par analyses MALDI-ToF présentées ci-dessous, le bioconjugué HSA-PG préparé à pH physiologique présente une masse moléculaire de 67 567 Da alors que la HSA incubée à pH physiologique sans pénicilline G (7) est à 66 570 Da. L'écart entre les deux échantillons est de 997 Da. Etant donné la masse moléculaire de la pénicilline G (7) de 334 Da, on peut estimer une moyenne de 3 molécules de pénicilline G (7) fixées sur la molécule de HSA. Par ailleurs les conditions de bioconjugaison ne modifient pas la structure de la HSA puisqu'une masse identique à la HSA native est retrouvée après que cette dernière ait été traitée dans les conditions d'hapténisation en absence de pénicilline G (7) (Figure 15).

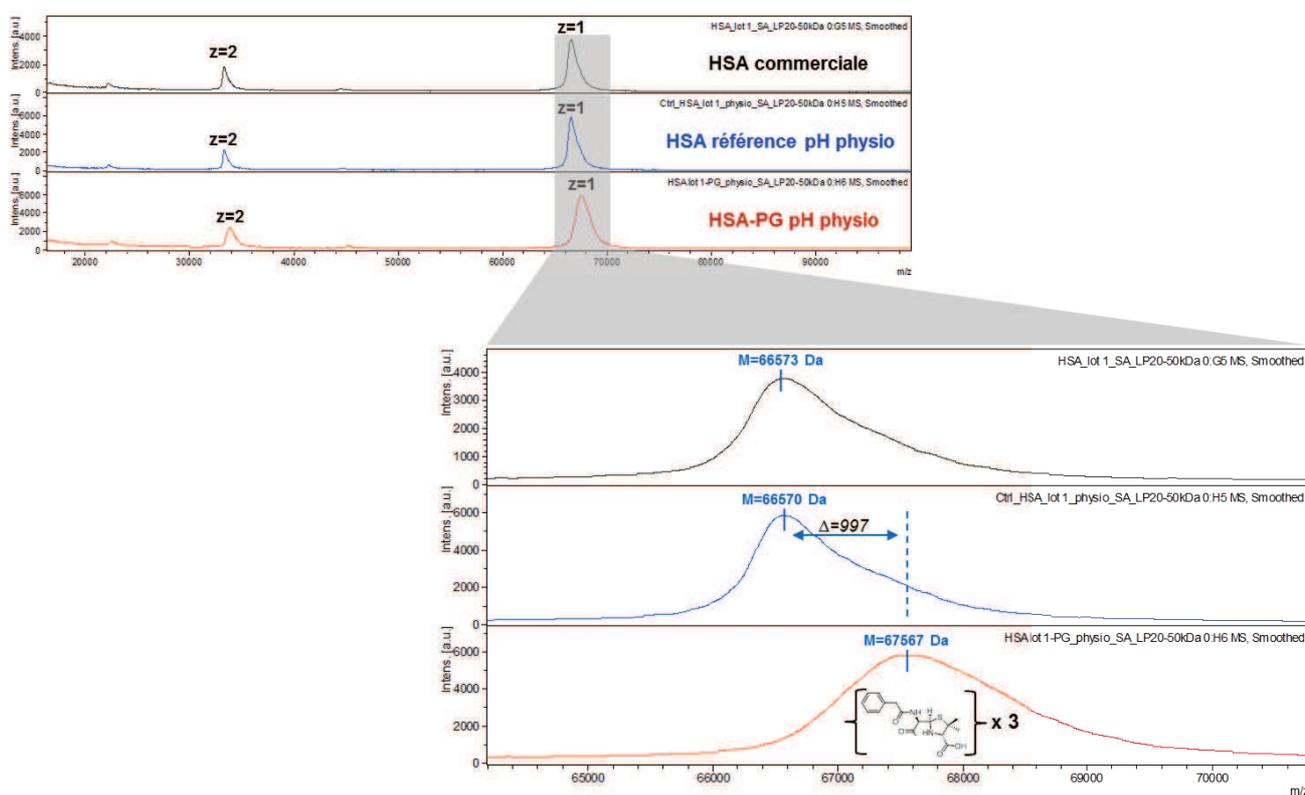


Figure 15 : Spectre de masse du bioconjugué HSA-PG obtenu à pH physiologique (en rouge) comparé à la HSA commerciale (en noir) et à la HSA traitée dans les conditions de couplage physiologiques (en bleu)

Il faut noter que les pics de masse obtenus sont larges et d'allure gaussienne. Ils correspondent en fait à un cluster de pics non résolus. La masse moyenne considérée est le centroïde de ce cluster. Si on considère la courbe dans son ensemble, on peut conclure que l'échantillon analysé est constitué d'HSA ayant fixé 1 à 6 molécules de pénicilline G (7), avec une plus grande proportion de HSA ayant fixé 3 molécules (Figure 16).

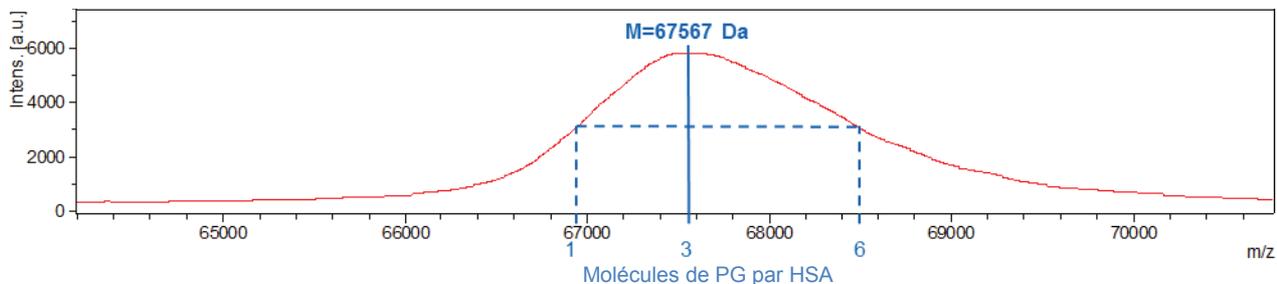


Figure 16 : Distribution du nombre de molécules de pénicilline G (7) fixées à la HSA après un traitement en conditions physiologiques

Pour ce qui est du bioconjugué HSA-PG à pH basique, le nombre de pénicilline G (7) hapténisant la protéine est plus élevé ce qui corrobore les résultats du western blot. Deux échantillons ont été analysés : les masses moléculaires obtenues sont de 71 558 Da et 72 357 Da. La HSA incubée en milieu basique sans pénicilline G (7) a une masse moléculaire de 66 572 Da. Les échantillons obtenus après traitement en milieu basique ont donc respectivement un écart de 4 986 et 5 785 Da avec la HSA traitée dans les mêmes conditions en absence de pénicilline G (7), soit une moyenne de 15 et 17 molécules de pénicilline G (7) par molécule de HSA. De même que dans le cas des bioconjugaisons menées à pH physiologique, les conditions basiques n'induisent pas de modification sur la HSA puisqu'aucune différence de masse n'est observée entre l'échantillon de HSA commercial et l'échantillon HSA de référence (Figure 17).

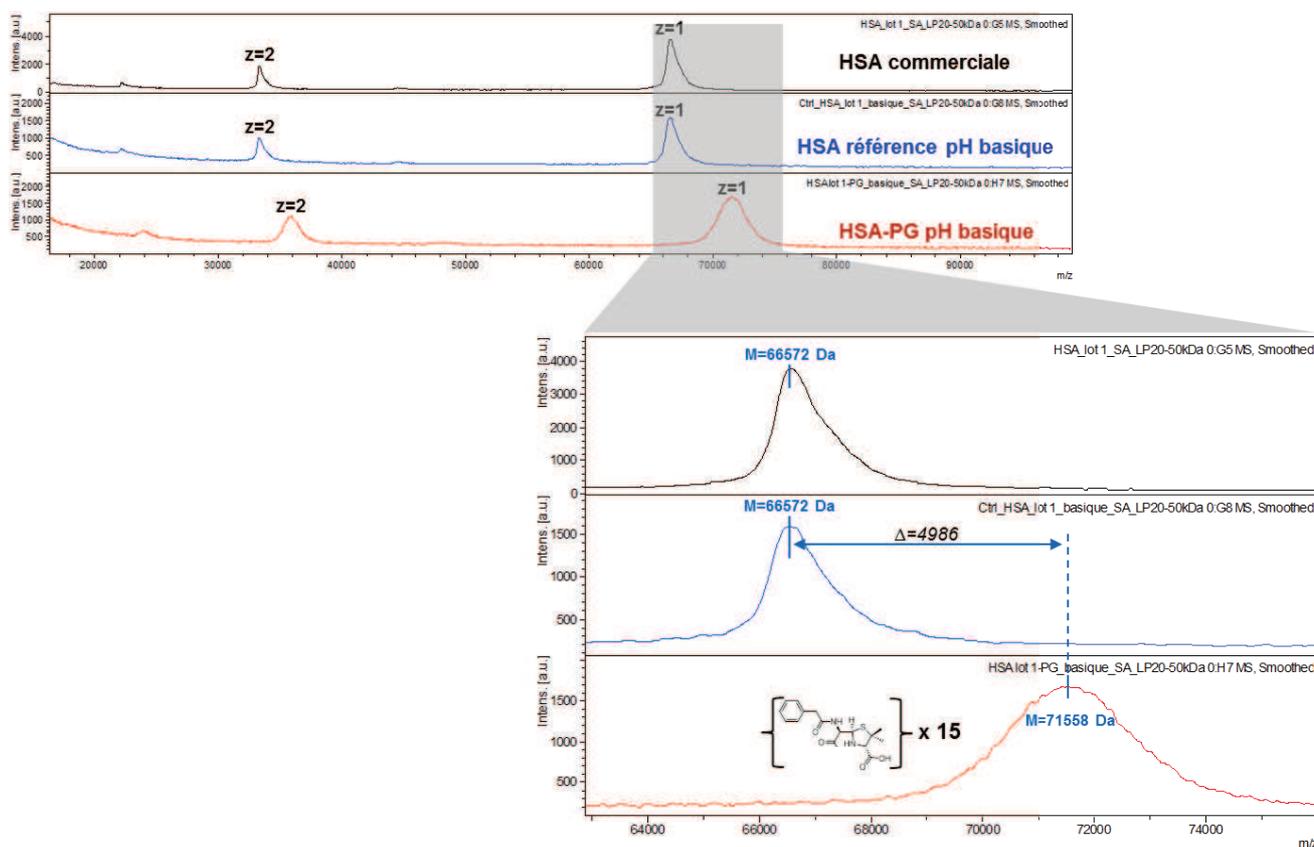


Figure 17 : Spectre de masse d'un des bioconjugués HSA-PG préparé à pH basique (en rouge) comparé à la HSA commerciale (en noir) et à la HSA traitée dans des conditions de couplage basiques (en bleu)

En considérant les courbes dans leur ensemble, à pH basique les bioconjugués HSA-PG ont fixés entre 11 et 19 molécules de pénicilline G (7) par molécule de HSA avec une plus grande proportion de HSA ayant fixé 15 molécules pour le premier lot (Figure 18). Pour le second lot, entre 13 et 22 molécules de pénicilline G (7) sont fixées, avec une plus grande proportion à 17 (courbes non présentées).

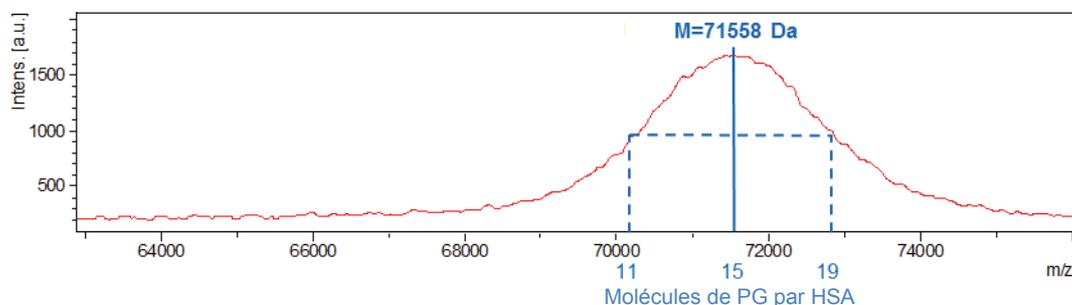


Figure 18 : Distribution du nombre de molécules de pénicilline G (7) fixées à la HSA après un traitement en conditions basiques

Les deux échantillons réalisés dans les mêmes conditions à pH basique présentent des degrés d'hapténisation différents, ce qui met en avant la difficulté de reproduire exactement les résultats de bioconjugaison.

De plus l'analyse MALDI-ToF n'est pas assez précise pour déterminer le nombre exact de molécules de pénicillines fixées à la protéine. Quand le taux de fixation est faible – comme dans le cas de l'hapténisation par l'amoxicilline (4) réalisée à pH physiologique (d'après l'analyse par western blot) – la technique de MALDI-ToF ne permet pas de distinguer d'écart de masse entre le blanc HSA et l'échantillon hapténisé. Une autre technique d'analyse par masse devra donc être employée pour permettre une détection du nombre de molécules d'amoxicilline (4) fixées sur la HSA.

b) Analyse par spectrométrie de masse des bioconjugués HSA-AX

Ainsi l'échantillon HSA-AX obtenu à pH physiologique a été analysé au moyen d'une chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse Impact HD (ESI) équipé d'un Q-ToF. Les spectres obtenus ont une meilleure résolution et une précision améliorée sur les mesures de masses par rapport aux analyses effectuées par MALDI-ToF. Par contre, les spectres obtenus sont plus difficilement analysables étant donné le grand nombre de molécules polychargées allant de 22 à 66 charges. Les spectres obtenus doivent donc être traités par un programme de déconvolution permettant de retrouver la valeur du m/z d'une molécule mono-chargée. Différentes espèces sont alors discernables et peuvent être identifiées grâce au spectre de déconvolution de masse de la HSA commerciale fournie par le fabricant. Parmi 5 pics de masse, 3 sont identifiés : la HSA non modifiée avec une masse moléculaire de 66 439 Da, la HSA cystéinylée à 66 557 Da et la HSA mono-glycosylée à 66 600 Da (Figure 19).

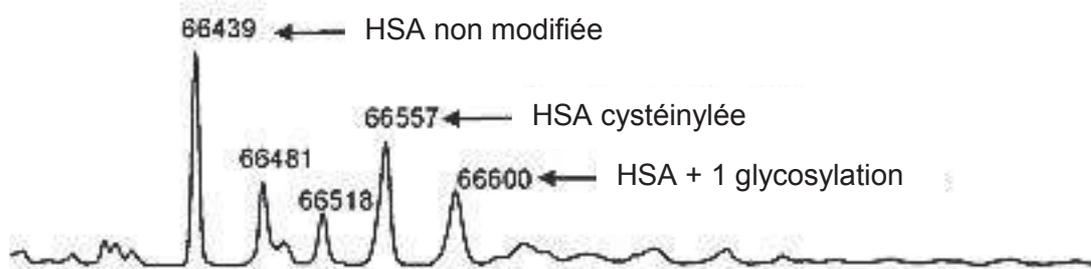


Figure 19 : Spectre de déconvolution de masse de la HSA commerciale

Les bioconjugués HSA-AX synthétisés à pH physiologique et à pH basique ont été analysés par cette technique. Le spectre de déconvolution de masse obtenu pour le bioconjugué HSA-AX préparé à pH physiologique est présenté en Figure 20. En majorité la HSA non modifiée est présente. Mais le spectre de masse présente également le même massif décalé de 365,5 Da, qui correspond à la HSA hapténisée 1 fois par l'amoxicilline (4). La même empreinte est également observée avec un écart de 731 Da et un de 1 097,5 Da par rapport à la HSA non modifiée, ce qui correspond à respectivement 2 et 3 molécules d'amoxicilline (4) sur une molécule de HSA. Donc à pH physiologique, la HSA est modifiée entre 0 et 3 fois par l'amoxicilline (4). Si toutes les espèces HSA modifiées se comportent de la même manière au niveau de leur degré d'ionisation, alors leurs intensités sont comparables. On peut donc affirmer que l'espèce non modifiée est la plus abondante. Comme vu précédemment, une comparaison entre les spectres des échantillons de référence et de la HSA commerciale montre que les conditions physiologiques n'induisent pas de modification sur la protéine (Figure 20).

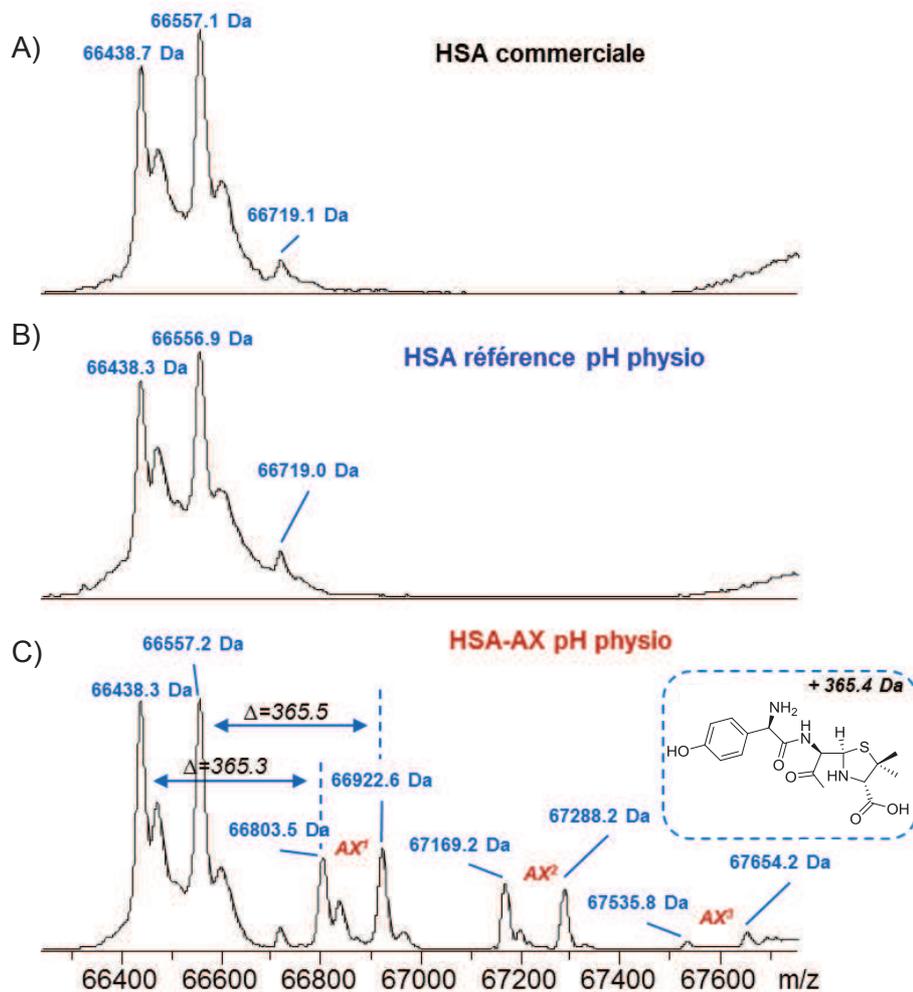


Figure 20 : Spectre de masse du bioconjugué HSA-AX préparé à pH physiologique (C) comparé à la HSA commerciale (A) et à la HSA traitée dans des conditions de couplage physiologiques (B)

Pour ce qui est du bioconjugué HSA-AX réalisé en condition basique, le spectre de déconvolution de masse montre 7 massifs semblables à la HSA commerciale, séparés les uns des autres par une masse de 365,5 Da. Etant donnée la masse moléculaire d'une molécule d'amoxicilline (4), chaque massif présente donc une incrémentation d'une molécule d'amoxicilline (4) par rapport à son voisin de masse inférieure. Le sommet du plus petit de ces massifs est à une masse de 67 899,1 Da, ce qui équivaut à 4 molécules d'amoxicilline (4) sur la HSA. Donc, dans les conditions basiques utilisées, la HSA est hapténisée par 4 à 10 molécules d'amoxicilline (4). Les espèces les plus abondantes étant celles hapténisées par 6 et 7 molécules d'amoxicilline (4) par protéine, en considérant que toutes les HSA hapténisées soient ionisées de manière similaire. Cependant, grâce à la meilleure résolution des spectres ESI obtenus par déconvolution de masse, une légère différence est observée entre le spectre de l'échantillon de référence et celui de la HSA commerciale. Le traitement en milieu basique dégraderait la HSA induisant une perte de masse d'environ 186 Da par rapport au massif initial. Cet écart de masse pourrait correspondre à la perte des deux acides aminés en position N-terminale, à savoir un acide aspartique et une alanine dont la somme des masses moléculaires est égale à 186,2 Da (Figure 21).

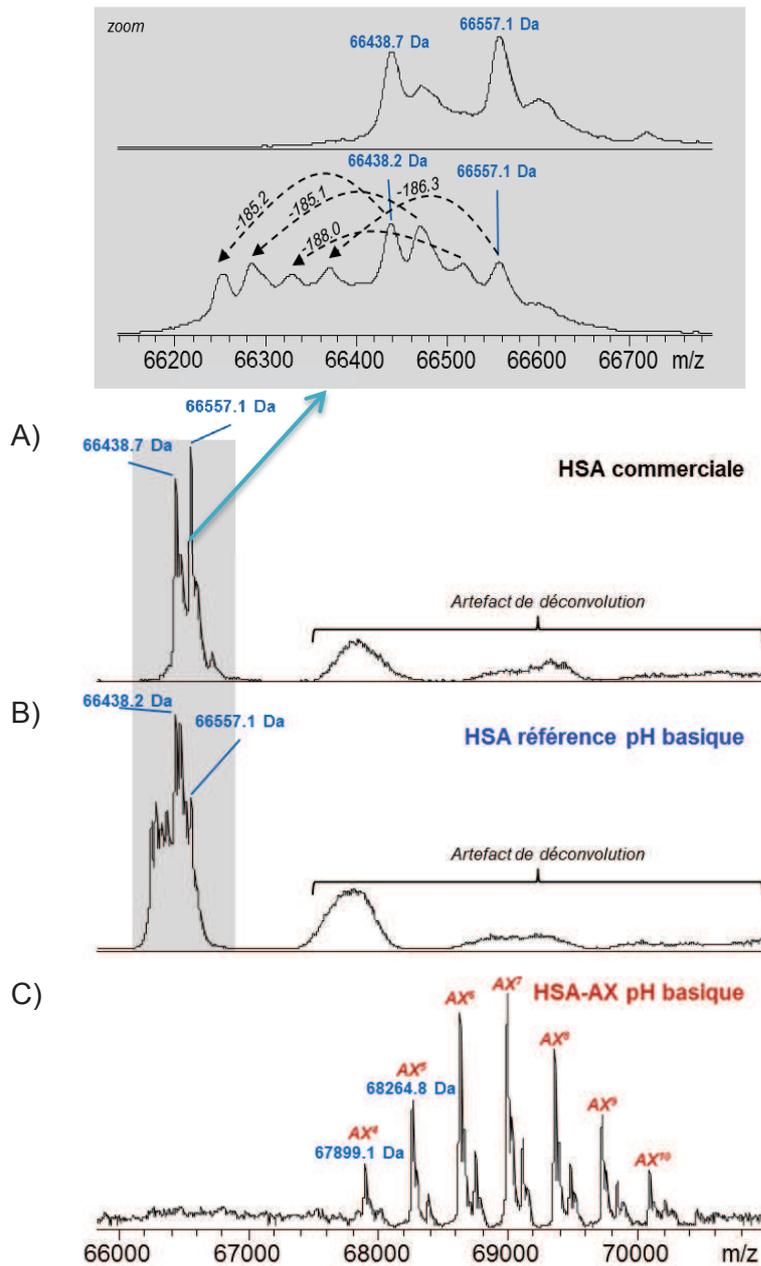


Figure 21 : Spectre de masse du bioconjugué HSA-AX préparé à pH basique (C) comparé à la HSA commerciale (A) et à la HSA traitée dans des conditions de couplage basiques (B)

c) Conclusion

En conclusion ces analyses de masse nous ont permis de prouver l'hapténisation de la HSA par les pénicillines, tant en milieu physiologique que dans des conditions basiques.

Dans des conditions de pH physiologique une molécule de HSA sera hapténisée par en moyenne 3 molécules de pénicilline G (7), avec un intervalle approximativement compris entre 1 et 6 molécules. Alors qu'elle ne sera hapténisée que par 0 à 3 molécules d'amoxicilline (4), avec une majorité de protéine non hapténisée. Les résultats de l'hapténisation de la HSA par l'amoxicilline (4) dans des conditions physiologiques peuvent être comparés avec ceux obtenus par Ariza et ses collaborateurs pour lesquels la HSA était modifiée par en moyenne 2 à 4 molécules d'amoxicilline (4) après une incubation de la protéine en présence de respectivement 18 ou 91 équivalents d'amoxicilline (4) dans des conditions physiologiques.¹²⁹

A pH basique, les résidus lysines sont tous sous leur forme amine libre. En moyenne la HSA est hapténisée par 15 à 17 molécules de pénicilline G (7), avec des intervalles de 11 à 19 et de 13 à 22 molécules selon les lots. Dans les mêmes conditions, seulement 4 à 10 molécules d'amoxicilline (4) sont fixées à la HSA, avec une majorité de protéines hapténisées par 6 et 7 molécules d'amoxicilline (4). Ces expériences corroborent la plus grande stabilité de l'amoxicilline (4) par rapport à la pénicilline G (7), et sa faible affinité pour les protéines de transport, confirmant les données de la littérature.¹⁵²

La posologie standard de pénicilline pour un adulte de 70 kg est de 1 à 2 g par jour (3 mmol à 6 mmol). De par sa faible stabilité, la pénicilline G (7) est injectée en continu sur une période d'environ 2h, alors que l'amoxicilline (4) est ingérée en une fois.¹⁰³ La HSA est présente à hauteur de 40 g/L de sang. Un adulte ayant environ 5 L de sang, il présente alors environ 200 g de HSA (3 mmol). Au total en considérant la dégradation, le volume de distribution, la clairance et la fixation plasmique de la pénicilline, le ratio molaire pénicilline/HSA dans le corps humain est environ de 0,1/1 après l'administration complète de la dose d'antibiotique.²¹⁵ Le ratio de 56/1 employé pour la synthèse des bioconjugués à pH physiologique est donc bien supérieur à ce qui est retrouvé *in vivo*. Ce rapport devra donc être pris en compte dans l'analyse de nos résultats biologiques : les sites de la HSA ayant pu être hapténisés en raison de l'excès de pénicilline. Cependant, il a été prouvé dans la littérature que l'hapténisation de la HSA par la pénicilline G (7) est facilitée en présence de sérum (4 à 5 fois supérieure), plutôt que dans un milieu tamponné à pH physiologique.²¹⁶ L'utilisation d'un excès de pénicilline par rapport à la HSA nous rapproche donc des conditions de couplage retrouvées *in vivo*.

L'étape suivante va consister en la détermination des acides aminés de la HSA ayant été hapténisés en utilisant la technique de la spectrométrie de masse tandem après digestion trypsique des bioconjugués formés dans des conditions biomimétiques ainsi que ceux formés dans des conditions basiques.

3) Détermination des acides aminés hapténisés par la pénicilline G et l'amoxicilline

Selon la littérature, les pénicillines hapténiseraient uniquement les résidus lysines des protéines (*cf.* Introduction partie III 1) a) Tableau 3 p.65).¹⁰⁰⁻¹⁰³ Pour identifier au départ de nos bioconjugués quels sont les acides aminés fixant les molécules de pénicilline, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée. Une stratégie classique consiste à faire subir une digestion trypsique à la protéine et à caractériser chaque peptide fragmenté. La trypsine est une enzyme qui clive les liaisons peptidiques d'une protéine en C-terminal des résidus basiques de sa séquence (lysine et arginine). Elle est l'enzyme de choix pour notre étude étant donné que si une lysine est hapténisée, elle ne sera plus sous sa forme N^{δ} -amine primaire basique. La trypsine ne viendra donc pas cliver le peptide après les résidus lysines hapténisés laissant apparaître ce que l'on appelle des « missed cleavage » (clivages manqués). Ces peptides comportant des « missed cleavages »

donneront un indice quant à la détermination des lysines hapténisées. De même la caractérisation des différents peptides attendus par la digestion trypsique nous permettra de déterminer si d'autres acides aminés de nature différente sont hapténisés.

a) Identification des acides aminés modifiés sur les bioconjugués HSA-PG

Les bioconjugués HSA-PG sont alors soumis à une digestion trypsique dans des conditions standard, puis analysés par nano-LC-MS/MS. D'après la littérature, la fragmentation MS/MS de la pénicilline G (7) par une source ESI est connue, et se traduit par une fragmentation laissant apparaître deux ions référents à m/z 160 ainsi qu'à m/z 217.¹⁰³ Ces deux fragments montrent respectivement le clivage du cycle thiazolidine lors de la fragmentation (en bleu sur le Schéma 36), et celui du cycle thiazolidine incrémenté du bras acétamide (en bleu et rouge sur le Schéma 36). Ils sont caractéristiques des pénicillines en général.^{103,127,128} Expérimentalement, ces deux ions référents sont recherchés dans les spectres de masse issus de la seconde fragmentation pour attester la présence de la pénicilline G (7) sur les peptides et permettre une présélection des spectres de masse à étudier.

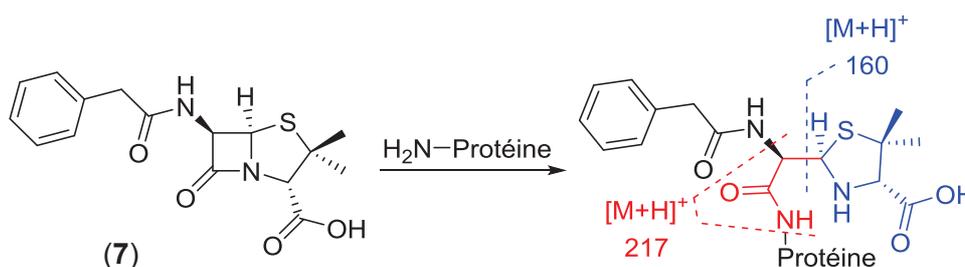


Schéma 36 : Déterminant antigénique de la pénicilline G (7) observé expérimentalement avec la coupure représentant l'adduit de masse observé à m/z 160 en bleu et m/z 217 en rouge et bleu, incluant la perte de la chaîne latérale et de la protéine

Les autres critères indiquant la présence de l'haptène pénicilloyle sur une lysine sont la présence d'un « missed cleavage » par la trypsine après la lysine hapténisée, associé à un gain de masse correspondant à la masse de l'haptène (ici 334 g/mol).

Chacun des spectres de masse présélectionnés par la présence des ions référents de la pénicilline a été analysé comme illustré dans la Figure 22 qui présente le spectre MS/MS du peptide ¹¹FK*DLGEENFK²⁰ modifié par la pénicilline G (7) sur la lysine 12 (marquée d'une *). Avec une source ESI, ce sont principalement les liaisons peptidiques qui sont fragmentées. Ce qui permet de retrouver l'enchaînement peptidique en retrouvant les acides aminés formant des fragments nommés « y_n » ou « b_n », avec n le nombre d'acides aminés considérés. Les fragments y_n représentent l'enchaînement des acides aminés de la partie C-terminale vers la N-terminale, et inversement pour les fragments b_n. La fragmentation pourra également avoir coupé la liaison amide entre la pénicilline G (7) et le peptide. L'enchaînement des acides aminés peut donc dans un premier lieu être déterminé sans considérer l'hapténisation. Il s'agit donc de reconstituer le peptide en cherchant sur le spectre

les fragments y_n et b_n par ordre croissant de n . Le plus simple est de commencer par y_1 , étant donné que l'acide aminé recherché est une lysine (146 Da) ou une arginine (174 Da) (dû à la digestion trypsique).

Par exemple sur la Figure 22, le pic correspondant à m/z 147,1166, est celui de l'ion $[M+H]^+$ d'une lysine. S'en suit la recherche du fragment y_2 . Ce dernier représente la lysine précédemment identifiée et un autre acide aminé parmi tous les naturels existants. Pour trouver ce dernier, les pics de masses les plus intenses incrémentés de 57 à 186 Da (de la glycine au tryptophane) par rapport à y_1 sont considérés. Ici, ce sont les pics compris entre m/z 204 et m/z 333. Les deux pics possibles sont donc ceux à m/z 276,1727 et m/z 294,1842, correspondant à l'addition d'un acide glutamique (147 Da) ou d'une phénylalanine (165 Da). La séquence de la HSA est ensuite utilisée pour aider à la détermination du fragment y_3 . Les positions de la séquence contenant l'enchaînement EK sont recherchées ainsi que le résidu suivant dans l'enchaînement. Au total, 6 séquences sont possibles (Entrées 1 à 6, Tableau 5), de même pour l'enchaînement FK, un total de 4 séquences est retrouvé (Entrées 7 à 10, Tableau 5). Avec peu de probabilité pour l'enchaînement $^{10}RFK^{12}$ puisque la trypsine coupe la séquence après les arginines, a moins d'un « missed cleavage » impliquant que la pénicilline ait hapténisé cette arginine.

Entrée	Séquence	$[M+H]^+$
1	$^{279}CEK^{281}$	379 Da
2	$^{284}LEK^{286}$	389 Da
3	$^{357}LEK^{359}$	389 Da
4	$^{464}HEK^{466}$	413 Da
5	$^{517}SEK^{518}$	363 Da
6	$^{555}VEK^{557}$	375 Da
7	$^{10}RFK^{12}$	450 Da
8	$^{18}NFK^{20}$	408 Da
9	$^{210}AFK^{212}$	365 Da
10	$^{376}EFK^{378}$	423 Da

Tableau 5 : Différentes séquences de la HSA contenant EK ou FK et leur $[M+H]^+$ respectif

Le seul pic retrouvé sur le spectre MS/MS est celui à m/z 408,2230, qui correspond donc à l'enchaînement $^{18}NFK^{20}$ (Entrée 8, Tableau 5). Le peptide retrouvé après une digestion trypsique serait donc $^{13}DLGEENFK^{20}$. Les fragments y_3 , y_4 , y_6 , y_7 et y_8 de ce peptide sont bien retrouvés sur le spectre, confirmant la détermination du peptide. Ce dernier présente une masse totale de 950 Da. Donc, incrémenté d'une molécule de pénicilline G (7), le peptide est à 1 284 Da. Cependant, 1 284 Da n'est pas un multiple de l'ion parent du spectre MS/MS qui est de m/z 520,9077. L'hypothèse

qu'un « missed cleavage » a eu lieu est alors émise. Le peptide serait donc $^{11}\text{FK}^*\text{DLGEENFK}^{20}$ avec la pénicilline sur la lysine 12, causant le « missed cleavage ». La masse de ce dernier est de 1 559 Da ce qui correspond au m/z 520,9077 avec $z = 3^+$. Les autres fragments représentatifs de ce peptide peuvent alors être retrouvés sur le spectre, tels que b_2 , b_3 et b_4 , ces derniers étant également retrouvés avec un gain de masse de 175 g/mol correspondant au fragment hapténisé par la pénicilline G (**7**) avec le clivage du cycle thiazolidine (Figure 22).

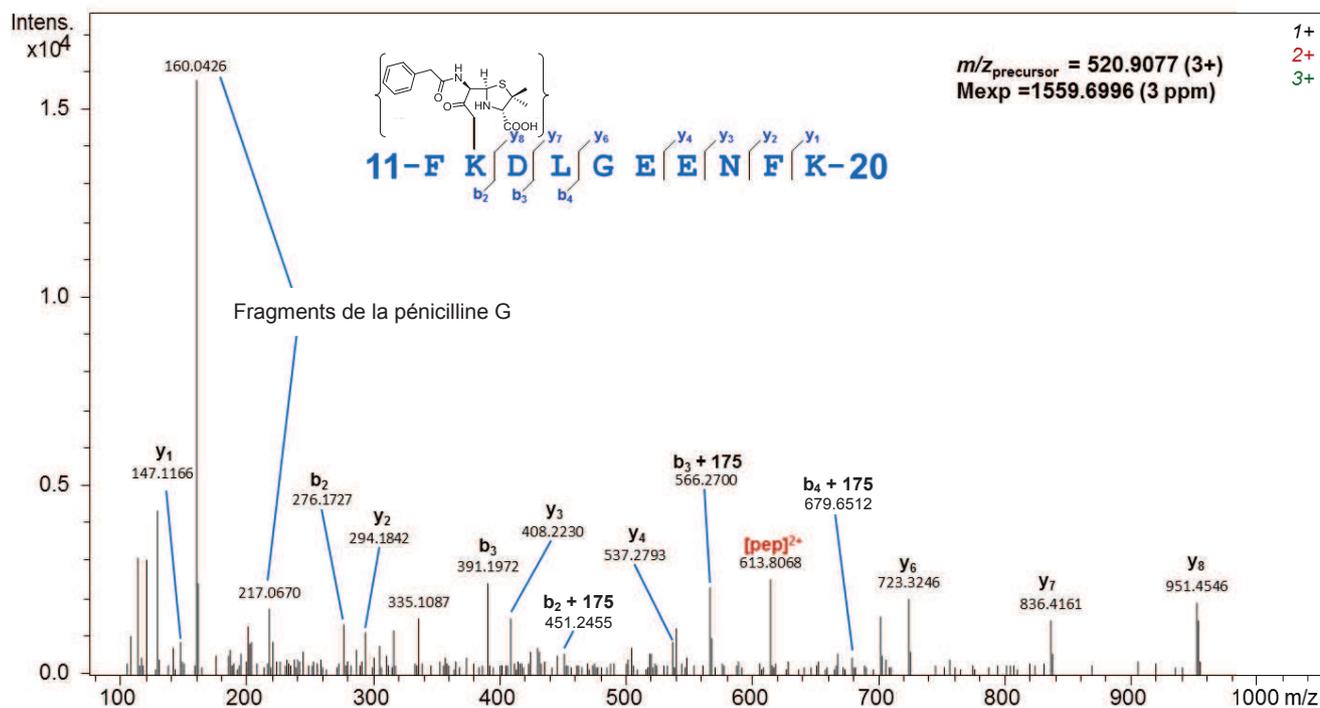


Figure 22 : Spectre MS/MS du décapeptide 11-20 de la HSA, hapténisé par une molécule de pénicilline G (**7**)

Pour chacun des peptides identifiés à partir des spectres MS/MS présélectionnés, il est possible de remonter à son ion parent et, grâce à son empreinte MS/MS, d'identifier les pics correspondant à ce peptide sur le chromatogramme nano-LC. On observe alors que la stéréochimie de l'haptène est conservée étant donné que pour une masse d'un ion parent, un seul pic est observé sur le chromatogramme de nano-LC. Cette observation montre que les conditions que nous avons employées sont non épimérisantes contrairement aux observations de Meng.¹⁰³ Celui-ci montre que dans un tampon phosphate en présence de HSA la pénicilline G (**7**) se réarrange en acide pénicillénique (**30**), donnant lieu après 16h d'incubation à une quantité non-négligeable (environ 25%) de déterminant antigénique épimérisé. De même, aucun diastéréoisomère n'a été observé avec nos bioconjugués réalisés dans des conditions basiques (ce qui est cohérent avec le fait que l'acide pénicillénique (**30**) est préférentiellement observé en milieu acide).¹⁰⁶

L'analyse des spectres MS/MS présentant les ions référents de la pénicilline G (7) réalisés sur le bioconjugué HSA-PG formé à pH physiologique a donc conduit à l'identification de 21 lysines hapténisées par la pénicilline G (7) (Entrée 4, Tableau 6). Tout comme dans la littérature, seules des lysines modifiées ont été identifiées, ce qui confirme la formation du déterminant antigénique majeur de la pénicilline G (7), non épimérisé. Pour ce qui est des deux bioconjugués réalisés à pH basique, 50 et 51 lysines sont hapténisées parmi les 59 lysines présentes sur la HSA. La fréquence d'hapténisation de chaque lysine n'a pour le moment pas pu être déterminée, ce qui rend difficile l'exploitation et la rationalisation de ces données. Cependant les 21 lysines identifiées sur le bioconjugué réalisé à pH physiologique sont toutes retrouvées dans chacun des deux lots de bioconjugués incubés en condition basique ce qui confirme l'hapténisation fréquente de ces lysines quelles que soient les conditions. Une comparaison des sites avec ceux identifiés par plusieurs auteurs a été effectuée.¹⁰⁰⁻¹⁰³ Les lysines retrouvées en commun avec nos résultats sont résumées dans le Tableau 6. 12 Lysines sont retrouvées plus particulièrement dans l'étude effectuée par Meng *et al.* sur des séra de patients et dans nos analyses.¹⁰³ Ces 12 lysines seront donc sélectionnées pour la poursuite de notre étude (Tableau 6).

Origine des bioconjugués	Sites hapténisés	Références
<i>In vivo et in vitro</i>	K190, K195, K199, K432, K541, K545	Yvon <i>et al.</i> ¹⁰⁰⁻¹⁰²
<i>In vitro</i>	K20, K137, K159, K190, K195, K199, K212, K351, K432, K525 K541, K545	Meng <i>et al.</i> ¹⁰³
<i>In vivo</i>	K20, K137, K159, K190, K195, K199, K212, K351, K372, K432 K436, K525, K541, K545	Meng <i>et al.</i> ¹⁰³
<i>In vitro</i>	K12, K73, K137, K159 , K162, K190, K195, K199, K212, K351 , K402 K414, K432, K436 , K439, K475, K500, K519, K525, K541, K545	Ce travail

Tableau 6 : Récapitulatif des sites trouvés comme étant hapténisés par la pénicilline G (7) sur nos bioconjugués en comparaison avec ceux de la littérature. Sont présentés en gras les sites retrouvés en commun entre les quatre études et notre travail

b) Identification des acides aminés modifiés sur le bioconjugué HSA-AX

Seul le bioconjugué HSA-AX réalisé dans des conditions biomimétiques a été exploité pour effectuer la recherche des acides aminés hapténisés. Ce bioconjugué est donc soumis à une digestion trypsique dans des conditions standard, puis le produit de digestion est analysé par nano-LC-MS/MS.

Ici aussi, la présence des fragments caractéristiques des pénicillines est recherchée pour confirmer l'hapténisation du peptide par l'amoxicilline (4). Dans l'étude d'Ariza, c'est le fragment à m/z 160 qui est observé, ainsi qu'un nouveau à m/z 349 qui résulte de la perte de l'amine primaire sur le résidu ouvert, et est donc spécifique de l'amoxicilline (4) (Schéma 37).¹²⁹

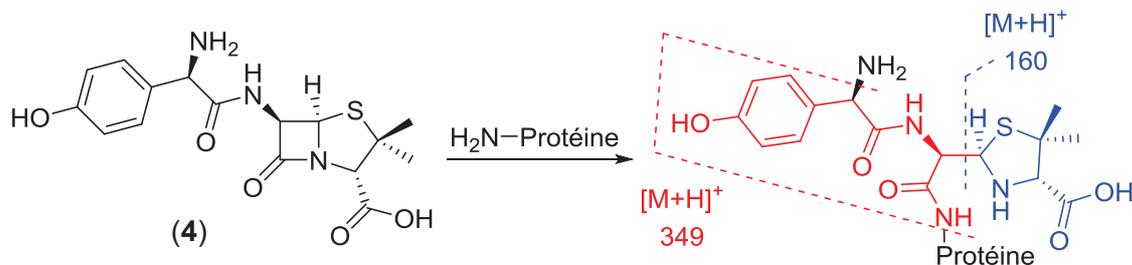


Schéma 37 : Déterminant antigénique de l'amoxicilline (4) observé expérimentalement avec la coupure représentant l'adduit de masse observé à m/z 160 en bleu et m/z 349 en rouge et bleu avec la perte de l'amine primaire et de la protéine

Ces deux ions référents caractéristiques de l'amoxicilline (4) ont donc permis la présélection des spectres MS/MS. Après l'analyse de ces spectres par la méthode présentée pour la pénicilline G (7) (cf. Figure 22 p.97), 10 lysines ont été identifiées comme étant hapténisées par l'amoxicilline (4). Comme pour la pénicilline G (7) seuls des résidus lysines ont été modifiés par l'amoxicilline (4), ce qui confirme la formation du déterminant antigénique observé dans la littérature.¹²⁹ Une comparaison est effectuée avec l'étude d'Ariza sur des bioconjugués formés *in vitro*, et 4 lysines sont retrouvées en commun (en gras dans le Tableau 7).

Origine des bioconjugués	Sites hapténisés	Référence
<i>In vitro</i>	K190 , K199, K351 , K432 , K541 , K545	Ariza <i>et al.</i> ¹²⁹
<i>In vitro</i>	K4, K190 , K195, K212, K351 , K432 , K436, K519, K525, K541	Ce travail

Tableau 7 : Récapitulatif des sites trouvés comme étant hapténisés par l'amoxicilline (4) sur le bioconjugué HSA-AX à pH 7,4, comparé à l'étude d'Ariza. Sont indiqués en gras les sites retrouvés en commun entre les deux études

La grande différence entre le chromatogramme de nano-LC-MS obtenu après digestion trypsique du bioconjugué HSA-PG synthétisé à pH physiologique et celui obtenu après digestion du bioconjugué HSA-AX également réalisé à pH physiologique réside dans le nombre de pics isomassiques observés. Nous avons précédemment vu qu'avec les bioconjugués HSA-PG aucune épimérisation du déterminant antigénique n'était observée. A l'inverse, avec le bioconjugué HSA-AX, la présence de deux à quatre espèces isomassiques est observée sur le chromatogramme nano-LC-MS pour 9 des 10 peptides identifiés. Et après la deuxième fragmentation les mêmes spectres MS/MS sont obtenus. Ces observations indiqueraient donc qu'une épimérisation de un à deux centres stéréogènes pourrait avoir lieu sur le déterminant amoxicilloyle, ce qui n'a pas été observé par Ariza et ses collaborateurs.¹²⁹ La Figure 23 ci-après illustre ces observations avec l'exemple du peptide 539-545 contenant une molécule d'amoxicilline (4) hapténisant la lysine 541. Les fragments spécifiques à m/z 160 et m/z 349 sont retrouvés, ainsi que certains fragments du peptide (y_2 , y_3 , y_4 et y_6 , et b_5 et b_6) et le fragment b_4 accompagné d'un gain de masse de 206 g/mol correspondant au

déterminant amoxicilloyle sans son cycle thiazolidine. Sur le chromatogramme nano-LC-MS observé en (B), deux pics à 23,4 et 23,8 minutes présentent le même ion parent à m/z 591,7947 avec $z = 2^+$, ce qui équivaut à une masse de 1 181,5737 Da et correspond bien au peptide présenté. Seule une épimérisation d'un des centres du déterminant amoxicilloyle (probablement le 6) peut expliquer ce résultat. Dans cet exemple l'une des deux formes est majoritaire, mais pour 5 peptides parmi les 10 identifiés les proportions des deux diastéréoisomères sont quasiment équivalentes. Ce profil de chromatogramme nano-LC-MS est retrouvé dans l'étude de Meng sur l'épimérisation de la pénicilline G (7).¹⁰³

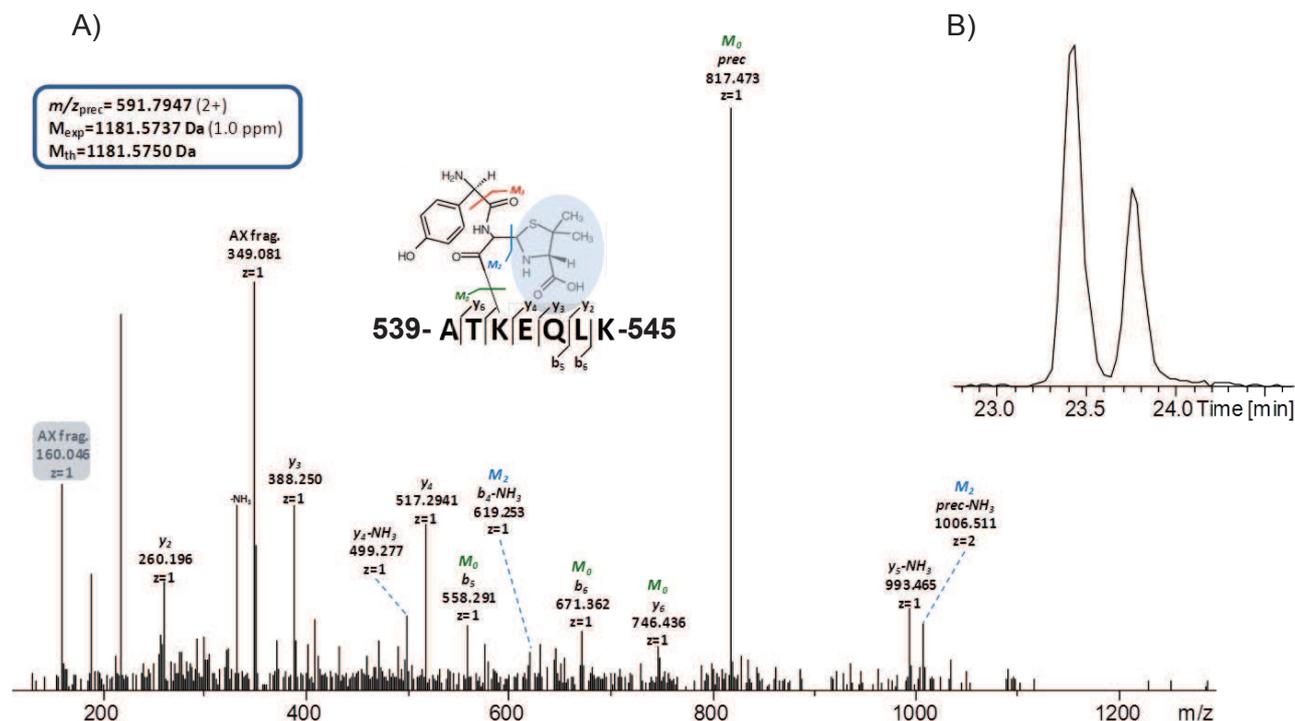


Figure 23 : Spectre MS/MS du peptide 539-545 de la HSA, hapténisé par une molécule d'amoxicilline (4) (A) et allure du chromatogramme nano-LC-MS du bioconjugué HSA-AX digéré par la trypsine, entre 22,8 et 24,6 min, les deux pics ayant pour ion parent m/z 591,7947 (B)

Cette épimérisation peut avoir eu lieu lors de la digestion du peptide, ou encore lors de la séparation par HPLC. Mais, elle peut également avoir eu lieu pendant le couplage entre l'amoxicilline (4) et la HSA. Compte tenu des observations sur la pénicilline G (7) et l'acide pénicillénique (30), transposées à l'amoxicilline (4), nous pouvons supposer que les deux centres épimérisés seraient les carbones 5 et 6 et comme pour la pénicilline G (7), cette épimérisation pourrait être due à un équilibre avec l'acide amoxicillénique (90), ou un intermédiaire plus stable, spécifique de l'amoxicilline (4), qui cycliserait *via* son amine primaire (91) (Schéma 38).

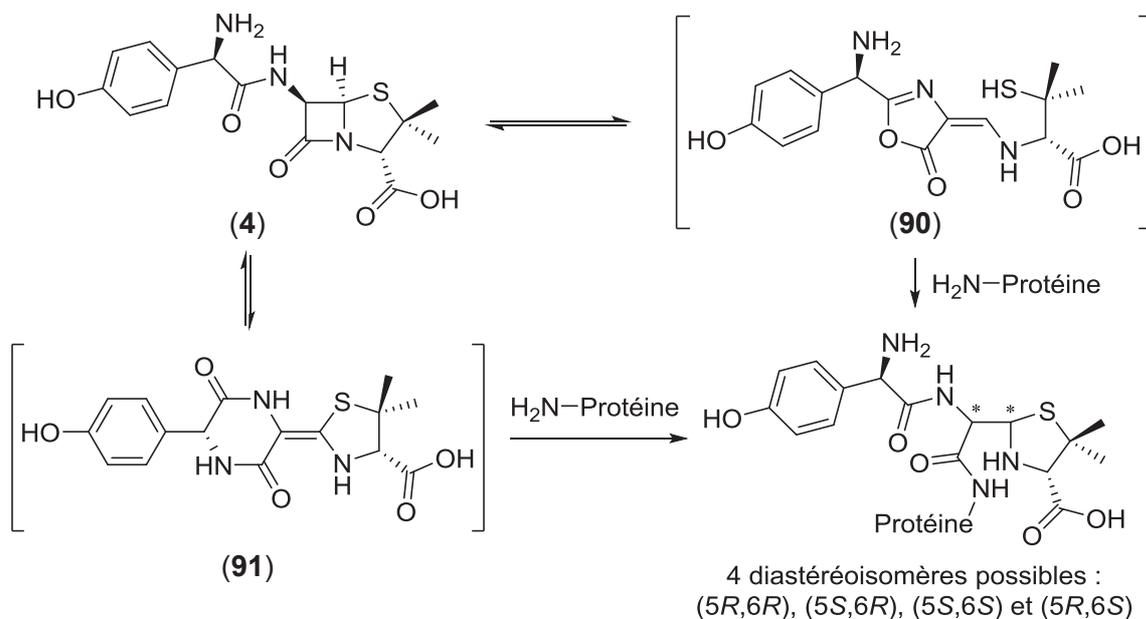


Schéma 38 : Formation des quatre diastéréoisomères possibles par le passage par l'acide amoxicillénique (90) ou par un intermédiaire plus stable (91)

Au vu de la publication d'Ariza *et al.*, les conditions d'élution pour la nano-LC-MS sont bien moins longues que celles que nous avons utilisées. Avec par exemple, pour le même peptide que celui présenté dans la Figure 23, le temps de rétention est de 7,8 min pour Ariza, alors que nous sommes à 23,4 et 23,8 min.¹²⁹ Les conditions mises en œuvre par Ariza pourraient donc ne pas avoir été suffisantes pour permettre de distinguer les deux diastéréoisomères présents. Inversement, ces conditions de séparation HPLC trop longues dans notre cas pourraient être à l'origine de l'épimérisation observée.

Suite à des tests biologiques d'immunogénicité des bioconjugués réalisés sur des lymphocytes T par les biologistes du projet, les bioconjugués HSA-PG, synthétisés à pH basique, induisent bien une réponse des lymphocytes.³⁸ Par contre le bioconjugué HSA-AX réalisé à pH basique n'en induit pas. Le seuil de détection des lymphocytes T a alors été mis en cause ainsi que la stabilité des bioconjugués HSA-AX. Nous avons donc réalisé des analyses de masse par MALDI-ToF sur des échantillons de HSA-AX synthétisés à pH basique et conservés dans une solution aqueuse tamponnée à un pH de 7,4 pendant un mois à -20°C. Si on compare le spectre de masse du composé HSA-AX de référence réalisé à pH basique (n'ayant pas subi de traitement) à 69 146 Da (en C sur la Figure 24), et ceux des mêmes bioconjugués mais ayant été conservés pendant 1 mois à -20°C dans une solution aqueuse à 69 139 et 69 188 Da (en D et E sur la Figure 24). Nous pouvons conclure, qu'avec un écart de masse de seulement 7 et 42 Da entre le contrôle et les échantillons, les bioconjugués conservés en phase aqueuse ne se sont pas dégradés après un mois à -20°C en solution. La possible épimérisation des bioconjugués en solution a donc été évoquée. D'après les tests effectués par Meng et ses collaborateurs, aucune épimérisation des bioconjugués n'est observée une fois que la pénicilline G (7) est ouverte par un résidu lysine.¹⁰³ Néanmoins au vu des résultats contradictoires que nous avons obtenu nous devons encore nous attacher à démontrer que les conditions de conservation ne sont pas épimérisantes.

Nous pouvons également observer en comparant la masse de 66 775 Da de la référence de HSA traitée à pH physiologique et celle à 66 534 Da de la référence de HSA traitée à pH basique que la dégradation de la HSA due aux conditions basiques est bien observable. De plus, l'échantillon HSA-AX synthétisé à pH basique – analysé pour le contrôle – présente une masse de 69 146 Da ce qui équivaut à une différence de 2 612 Da avec la référence HSA, soit une moyenne de 7 molécules d'amoxicilline (4) covalamment liées à la protéine, ce qui corrobore le résultat de l'analyse au Q-ToF (Figure 24).

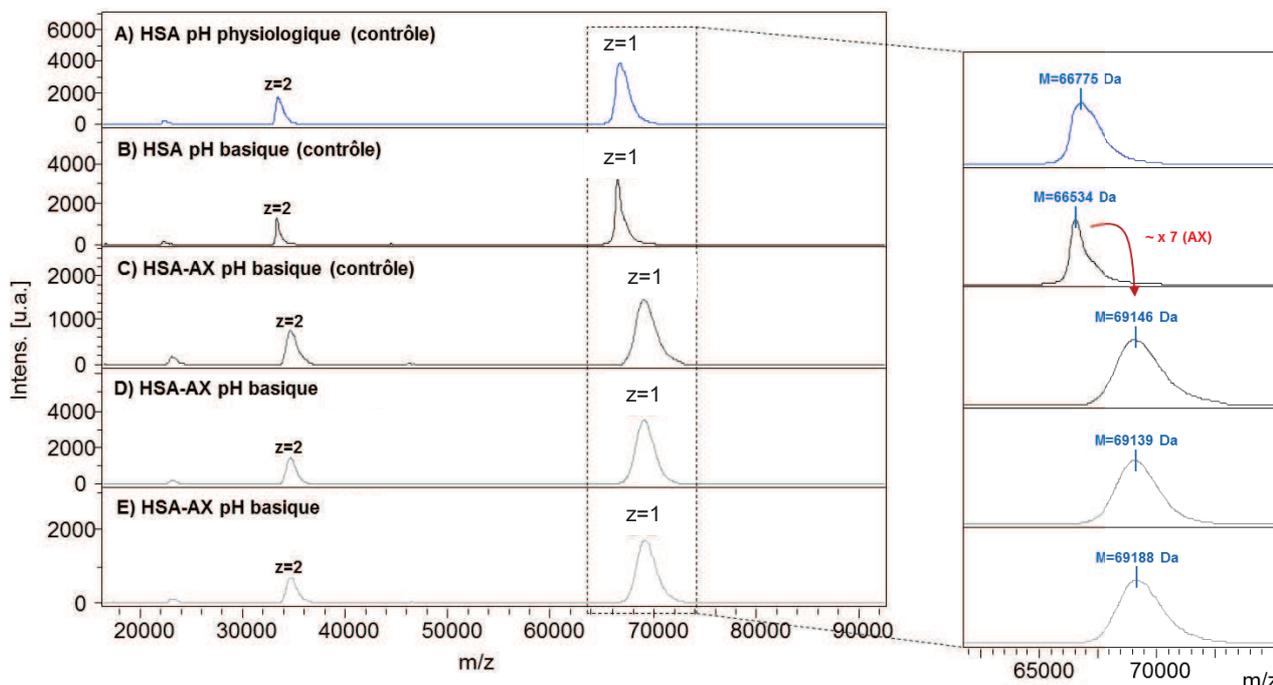


Figure 24 : Spectres de masse MALDI-ToF du bioconjugué HSA-AX réalisé à pH basique sans traitement (C), comparé aux mêmes bioconjugués laissés dans une solution aqueuse à -20°C pendant 1 mois (D et E), avec pour référence les blancs HSA réalisés dans des conditions de couplage physiologiques (A) et basiques (B)

4) Conclusion sur la recherche des acides aminés hapténisés

En conclusion, avec les bioconjugués HSA-PG formés en milieu basique une cinquantaine de lysines de la HSA ont été identifiées comme étant hapténisées, mais la fréquence d'hapténisation de chaque lysine n'a pas encore été déterminée. Seuls les résultats des bioconjugués réalisés à pH physiologique ont été pris en considération.

Au total, 21 lysines ont pu être identifiées comme étant hapténisées sur le bioconjugué HSA-PG réalisé à pH physiologique et 10 pour le bioconjugué HSA-AX synthétisé dans les mêmes conditions. L'analyse de masse par MALDI-ToF du bioconjugué HSA-PG synthétisé à pH 7,4 a révélé une moyenne de 3 molécules de pénicilline G (7) par protéine (approximativement entre 1 et 6). Et une analyse ESI-Q-ToF a permis de détecter entre 0 et 3 molécules d'amoxicilline (4) sur le bioconjugué HSA-AX réalisé dans des conditions physiologiques de couplage. Nous constatons donc que les clusters de pics de masse correspondent à un mélange de molécules HSA hapténisées par un nombre variable de molécules de pénicilline et sur plusieurs résidus lysines différents.

Les haptènes ont été identifiés comme étant sous la forme du cycle β -lactame ouvert par une lysine. Un seul diastéréoisomère a été observé pour le bioconjugué HSA-PG par contre deux à quatre diastéréoisomères sont observés lors de l'analyse du bioconjugué HSA-AX. Une étude sur la stabilité du bioconjugué HSA-AX a également été entreprise, permettant d'affirmer que le bioconjugué est bien stable au moins un mois conservé dans une solution aqueuse tamponnée à pH physiologique à -20°C. Cependant la stabilité configurationnelle reste à démontrer.

Les résultats ont par la suite été comparés avec ceux de la littérature, en particulier pour la pénicilline G (7), où une étude de Meng et ses collaborateurs présente les différentes lysines hapténisées *in vivo* par cet antibiotique.¹⁰³ Pour pouvoir se rapprocher le plus possible de ces résultats nous avons décidé de les comparer avec ceux obtenus avec le bioconjugué HSA-PG à pH physiologique, et de ne sélectionner, pour la suite de ce travail de thèse, que les lysines retrouvées en commun avec l'étude *in vivo* de Meng (*cf.* Entrée 2, Tableau 3 p.65). Un total de 12 lysines a été sélectionné pour poursuivre l'étude sur la pénicilline G (7). Pour ce qui est de l'étude sur l'amoxicilline (4), 4 lysines ont été retenues par rapport aux travaux réalisés *in vitro* par Ariza (*cf.* Entrée 3, Tableau 3 p.65).¹²⁹ Par analogie avec les travaux de Meng réalisés *in vivo* sur la pénicilline G (7), 4 autres lysines ont été sélectionnées (Tableau 8).¹⁰³ En effet, les deux antibiotiques sont de la même famille chimique, l'amoxicilline (4) ayant juste une capacité moindre à se fixer sur la HSA.¹⁵²

β -lactame	Sites sélectionnés
Pénicilline G (7)	K137, K159, K190, K195, K199, K212, K351, K432, K436, K525, K541, K545
Amoxicilline (4)	K190, K195 , K212 , K351, K432, K436 , K525 , K541

Tableau 8 : Récapitulatif des sites hapténisés sélectionnés pour cette étude pour la pénicilline G (7) et l'amoxicilline (4). Sont représentées en gras les lysines sélectionnées pour l'étude sur l'amoxicilline (4) non retrouvées dans l'étude d'Ariza mais présentes dans celle de Meng *et al.*¹⁰³

Une fois les sites de l'hapténisation déterminés, la présélection de peptides potentiellement épitopes sera réalisée par modélisation moléculaire.

II. Sélection *in silico* des peptides potentiellement épitopes

Dans cette partie, deux techniques de modélisation *in silico* vont être mises en œuvre dans le but de pouvoir sélectionner un peptide de 15-mers pour chacun des sites sélectionnés dans la partie précédente. Un modèle simplifié doit être mis en place pour éviter de compliquer les calculs. Chaque peptide sera donc évalué avec une lysine classique à la place de la lysine hapténisée par une pénicilline. Les lysines sur lesquelles la modélisation se portera seront donc les 12 trouvées avec le

bioconjugué HSA-PG (étant donné que les 8 lysines trouvées sur le bioconjugué HSA-AX sont comprises dedans) : K137, K159, K190, K195, K199, K212, K351, K432, K436, K525, K541 et K545. La séquence de la HSA téléchargée sur la PDB sous le code 1AO6 sera utilisée pour connaître l'enchaînement peptidique autour de chacune des lysines.²¹⁷ La partie modélisation par le logiciel IEDB a été réalisée en collaboration avec le laboratoire chimie pour le vivant (LCV) du commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Saclay, et plus particulièrement avec le Dr Bernard Maillère, dans l'équipe d'immunochimie de la réponse immunitaire cellulaire.

1) Modélisation par le logiciel IEDB MHC-II-binding

Le logiciel IEDB MHC-II-binding (tools.immuneepitope.org/mhcii/) est le plus adapté pour notre étude étant donné la longueur de 15-mers sélectionnée pour nos peptides et la prise en compte de ce critère par la méthode NN-align de l'IEDB (cf. Introduction partie III 2) p.67).^{180-182,186-191,193}

Quinze peptides de 15-mers faisant passer la lysine d'intérêt de la position 1 (*N*-terminale) à la position 15 (*C*-terminale) ont donc été considérés pour chacune des 12 lysines, permettant de calculer la probabilité d'accroche du peptide en considérant l'acide aminé d'intérêt à chaque position. Le logiciel a donc calculé – par la méthode du consensus – la probabilité d'accroche entre un total de 180 peptides de 15-mers avec les 7 allèles des HLA-DRB1 les plus fréquemment rencontrés dans la population caucasienne, à savoir : HLA-DRB1*0701, 1101, 1301, 0401, 0301, 1501 et 0101 (cf. Introduction partie III 2) p.67). A ce total de 1 260 valeurs, exprimées en percentile, une sélection des peptides ayant le plus de probabilité d'accroche (percentile le plus bas) dans la poche des 7 allèles HLA les plus représentés dans la population caucasienne a été effectuée. Les allèles les plus représentés parmi les 7 sélectionnés étant ceux favorisés lors de la sélection. Le Tableau 9 ci-après exemplifie la méthode de sélection avec la lysine 212. Parmi toutes les valeurs, les minima sont mis en couleur, et pour chaque peptide, la moyenne et la médiane des valeurs sont calculées, ainsi que celles pour chaque allèle. Le peptide possédant la plus petite moyenne et celui avec la plus petite médiane sont sélectionnés, ici le même peptide FS-15 (la nomenclature utilisée pour nommer les peptides consiste à donner les lettres représentatives des premiers et derniers acides aminés du peptide, suivi de la longueur de ce dernier exprimée en mers). D'autres peptides peuvent être sélectionnés en faisant des compromis sur le plus possible de minima par allèles et des valeurs les plus basses possibles pour les autres allèles. Trois autres peptides sont alors sélectionnés (SV-15, KL-15 et ER-15) ce qui fait un total de 4 peptides sélectionnés pour la lysine 212 (Tableau 9).

Peptide	Allèles HLA-DRB1*							Moyenne	Médiane
	0701	1101	1301	0401	0301	1501	0101		
LKASLQKFGGERAFK*	45,27	19,36	2,65	20,33	33,63	24,19	53,70	24,24	22,26
KCASLQKFGGERAFK*A	49,40	21,82	2,65	33,19	34,18	21,07	52,41	27,05	27,51
CASLQKFGGERAFK*AW	49,40	21,82	2,65	32,65	34,95	21,45	52,41	27,15	27,24
ASLQKFGGERAFK*AWA	49,40	21,82	2,65	32,65	36,75	21,98	52,41	27,54	27,32
SLQKFGGERAFK*AWAV	11,30	21,82	2,65	29,56	60,54	9,66	16,15	22,59	16,56
LQKFGGERAFK*AWAVA	12,76	21,82	2,65	32,65	61,68	9,66	18,32	23,54	17,29
QKFGGERAFK*AWAVAR	12,76	30,46	33,93	32,65	34,98	18,26	14,22	27,17	31,56
KFGGERAFK*AWAVARL	3,29	8,88	5,40	17,50	18,67	13,05	9,06	11,13	10,97
FGERAFK*AWAVARLS	3,18	5,58	5,40	14,44	18,67	13,33	9,36	10,10	9,46
GERAFK*AWAVARLSQ	4,65	3,72	5,40	15,58	18,67	13,94	10,53	10,33	9,67
ERAFK*AWAVARLSQR	4,61	3,72	5,40	14,77	18,62	15,74	9,90	10,48	10,09
RAFK*AWAVARLSQRF	4,84	3,72	5,40	15,72	18,62	17,95	11,59	11,04	10,56
AFK*AWAVARLSQRFP	10,05	3,72	5,40	19,78	18,62	21,00	21,42	13,10	14,34
FK*AWAVARLSQRFPK	12,04	3,72	5,40	24,73	18,62	20,37	24,78	14,15	15,33
K*AWAVARLSQRFPKA	22,00	8,53	6,41	21,66	18,62	25,38	49,81	17,10	20,14
Min	3,18	3,72	2,65	14,44	18,62	9,66	9,06	10,10	9,46
2nd min	3,29	5,58	5,40	14,77	18,67	13,05	9,36	10,33	9,67
Moyenne	19,66	13,37	6,27	23,86	29,72	17,80	27,07	18,45	18,02
Médiane	12,04	8,88	5,40	21,66	18,67	18,26	18,32	17,10	16,56

Tableau 9 : Probabilité d'accroche des 15 peptides de 15-mers autour de la lysine 212 (marquée d'une *) pour les 7 allèles HLA-DRB1 les plus représentés dans la population caucasienne. Les minima, pour chaque allèle, sont représentés en couleurs dégradées par ordre croissant (rouge-orange-jaune-rose-violet), et bleu pour les moyennes et médianes

Au total, 30 peptides ont pu être présélectionnés de cette manière pour les 12 lysines. Le deuxième critère à prendre en compte est donc la position de la lysine hapténisée par l'antibiotique. Elle doit être dirigée vers le TcR pour s'assurer de la bonne présentation de l'antibiotique au lymphocyte T. Les 9 acides aminés présents dans la poche des différents allèles de HLA sont également fournis par le logiciel sous le nom de « core ». Ayant utilisé la méthode du consensus pour le calcul d'affinité entre les peptides et les allèles HLA, différents « cores » sont disponibles, correspondant aux différentes méthodes utilisées par le consensus.¹⁹⁰ La méthode de choix pour cette étude étant la NN-align, les « cores » utilisés sont donc ceux fournis par cette méthode.¹⁹³ Seulement cette méthode n'a pas été étendue à l'allèle HLA-DRB1*1301, le seul « core » disponible pour cet allèle est celui de la méthode de Sturniolo *et al.*²¹⁸ Comme vu précédemment, l'orientation des peptides suivra la théorie, les positions adéquates pour la lysine hapténisée seront donc les 2, 3, 5, 8 et -1, la position juste après le premier acide aminé du site d'ancrage (on compte de la partie N-terminale à la C-terminale).¹⁷⁴ Sachant que la position 5 est celle au milieu de la poche HLA, c'est donc la position préférée pour une présentation au TcR.

210 « Cores » ont donc été analysés pour les 30 peptides présélectionnés sur les 7 allèles les plus représentés dans la population caucasienne. La Figure 25 ci-après résume la méthode employée pour sélectionner le meilleur peptide pour la lysine 212. Quand la lysine 212 (en gras, italique et soulignée) est positionnée dans une colonne verte, le peptide est sélectionnable pour cet allèle, par contre si elle est dans une colonne rouge le peptide n'est pas recommandé. La zone flanquante représentée en blanc n'est pas favorable mais nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que les antibiotiques ne seront pas reconnus à cette position. La sélection est donc effectuée en favorisant le plus possible de peptides bien positionnés ou dans la zone flanquante pour les allèles les plus représentés parmi les 7. Dans l'exemple de la lysine 212 le peptide FS-15 est bien positionné pour tous les allèles et est même en position 5 pour l'allèle HLA-DRB1*0101, c'est donc ce peptide qui est sélectionné pour représenter le peptide potentiellement épitope pour la lysine 212 (Figure 25).

Allèle	peptide					-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11						
HLA-DRB1*07:01	SV-15			S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V						✓
HLA-DRB1*03:01	SV-15							S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V		-
HLA-DRB1*01:01	SV-15				S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V					✓
HLA-DRB1*11:01	SV-15			S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V						✗
HLA-DRB1*15:01	SV-15			S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V						✗
HLA-DRB1*13:01	SV-15							S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V		-
HLA-DRB1*04:01	SV-15				S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V					✓
HLA-DRB1*07:01	KL-15				K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L					✓
HLA-DRB1*03:01	KL-15			K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L						✓
HLA-DRB1*01:01	KL-15				K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L					✓
HLA-DRB1*11:01	KL-15					K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L				✗
HLA-DRB1*15:01	KL-15				K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L					✗
HLA-DRB1*13:01	KL-15					K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L				✗
HLA-DRB1*04:01	KL-15			K	F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L						✓
HLA-DRB1*07:01	FS-15			F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S						✓
HLA-DRB1*03:01	FS-15			F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S						✓
HLA-DRB1*01:01	FS-15				F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S					✓
HLA-DRB1*11:01	FS-15			F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S						✓
HLA-DRB1*15:01	FS-15			F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S						✓
HLA-DRB1*13:01	FS-15			F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S						✓
HLA-DRB1*04:01	FS-15			F	G	E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S						✓
HLA-DRB1*07:01	ER-15				E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R					✓
HLA-DRB1*03:01	ER-15				E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R					✓
HLA-DRB1*01:01	ER-15				E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R					✓
HLA-DRB1*11:01	ER-15			E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R						✗
HLA-DRB1*15:01	ER-15				E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R					✓
HLA-DRB1*13:01	ER-15				E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R					✓
HLA-DRB1*04:01	ER-15				E	R	A	F	<u>K</u>	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R					✓

Figure 25 : Position des 4 peptides présélectionnés pour la lysine 212, pour les 4 allèles les plus représentés dans la population caucasienne, en fonction du « core » donné par la méthode NN-align et celle de Sturniolo pour l'allèle 1301. La lysine 212 est représentée en gras, italique et soulignée. Les colonnes vertes représentent les positions de la poche dirigées vers le TcR tandis que les rouges représentent celles dirigées vers le HLA. A droite sont résumés les bons peptides ou non avec les positions 5 surlignées en jaune et les zones flanquantes un - bleu

Des compromis doivent parfois être réalisés entre bonne probabilité d'accroche et bonne orientation pour chaque allèle. Au final un peptide a pu être sélectionné pour chacune des 12 lysines sauf pour les lysines 195 et 199 où deux peptides ont été sélectionnés, les compromis étant plus difficiles à faire. 14 Peptides ont donc été sélectionnés en vue d'être synthétisés et testés sur des lymphocytes T (Tableau 10).

Lysine d'intérêt	Peptides sélectionnés
137	LKK ₁₃₇ YLYEIARRHPYF
159	PELLFFAK ₁₅₉ RYKAAFT
190	LRDEGK ₁₉₀ ASSAKQRLK
195	LRDEGKASSAK ₁₉₅ QRLK SSAK ₁₉₅ QRLKCASLQKF
199	LRDEGKASSAKQRLK ₁₉₉ SSAKQRLK ₁₉₉ CASLQKF
212	FGERAFK ₂₁₂ AWAVARLS
351	VLLLLRLAK ₃₅₁ TYETTL
432	TPTLVEVSRNLGK ₄₃₂ VG
436	VEVSRNLGKVGSK ₄₃₆ CC
525	KERQIKK ₅₂₅ QTALVELV
541	LVELVKHKPKATK ₅₄₁ EQ
545	KEQLK ₅₄₅ AVMDDFAAFV

Tableau 10 : Récapitulatif des peptides sélectionnés pour les 12 lysines d'intérêt

Pour confirmer la bonne sélection des sites, une autre méthode de modélisation moléculaire est mise en œuvre : la simulation par dynamique moléculaire. Cet outil est puissant mais demande un équipement spécialisé (un super-ordinateur capable d'effectuer les nombreux calculs en peu de temps), ainsi qu'une expertise dans l'utilisation des logiciels et beaucoup de temps pour analyser les résultats. C'est pourquoi nous avons mis au point cette partie grâce à une collaboration avec l'institut de biologie et chimie des protéines de Lyon (IBCP – UMR5086) dans l'équipe de bio-informatique structures et interactions (BISI), avec le Pr Raphaël Terreux ainsi que le Dr Julie-Anne Chemelle. Les modélisations de dynamique moléculaire ne seront effectuées que sur les peptides déjà sélectionnés étant donné la complexité de la mise en place de la technique. La modification apportée par l'antibiotique n'est pas prise en compte pour pouvoir simplifier les calculs, les 5 peptides sélectionnés pour les lysines 190, 195 et 199 seront donc les mêmes deux peptides nommés LK-15 pour le LRDEGK₁₉₀ASSAK₁₉₅QRLK₁₉₉, et SF-15 pour le peptide SSAK₁₉₅QRLK₁₉₉CASLQKF. En tout la modélisation par dynamique moléculaire n'a, pour le moment, été mise en place que sur 9 des 11 peptides sélectionnés, à savoir : LF-15, PT-15, LK-15, SF-15, FS-15, VL-15, TG-15, VC-15 et KV-15.

2) Modélisation par simulation de dynamique moléculaire

La première étape en vue de la modélisation par dynamique moléculaire est de générer les structures 3D des protéines HLA pour les 7 allèles d'intérêt. Pour cela, la PDB dispose déjà de quelques structures, notamment celle du HLA-DRB1*0101 (1SEB).²¹⁹ Pour rappel, d'après la nomenclature des CMH le « D » signifie classe II, le « R » représente la famille de l'allèle et le « B » signifie que ce gène code pour la chaîne β du HLA, pour avoir un HLA complet il faut également y ajouter la chaîne α , le nom du CMH sera donc HLA-DRA. Contrairement au haut polymorphisme de la chaîne β , la chaîne α du HLA-DR est la même chez tous les individus, c'est pourquoi un seul HLA-DRA a été utilisé pour toutes les simulations : HLA-DRA*0101 (3PDO).²²⁰ Par contre, la PDB ne dispose pas de toutes les structures des chaînes β des molécules des 7 allèles souhaités. L'avantage des protéines HLA-DRB1, est qu'elles sont des molécules qui sont très similaires au niveau de leur structure 3D. Il est donc possible d'établir la structure 3D des autres HLA-DRB1 par homologie avec la HLA-DRB1*0101. Pour ce faire, le logiciel Geno3D, développé à l'IBCP de Lyon, a été utilisé.²²¹ A partir de la structure 3D du HLA-DRB1*0101 (1SEB), et avec les séquences peptidiques des autres HLA-DRB1, disponibles sur la base de données IMGT,^{222,223} ce logiciel est capable, par homologie, de construire les protéines manquantes. Le Tableau 11 ci-après résume pour chaque allèle, le nom complet de l'allèle téléchargé sur l'IMGT ainsi que le pourcentage de similarité entre les séquences utilisées et celle du HLA-DRB1*0101 (1SEB).

Nom d'allèle utilisé	Nom d'allèle complet (IMGT)	Similarité de la séquence avec 1SEB
0101	DRB1*01:01:01	100%
0301	DRB1*03:01:01:01	89%
0401	DRB1*04:01:01	91%
0701	DRB1*07:01:01:01	89%
1101	DRB1*11:01:01	91%
1301	DRB1*13:01:01	90%
1501	DRB1*15:01:01:01	93%

Tableau 11 : Pourcentage de similarité entre le HLA-DRB1*0101 (1SEB) et les séquences des protéines téléchargées sur la base de données IMGT avec le nom complet de l'allèle utilisé

Une fois toutes les structures 3D générées, le logiciel Sybyl-X est utilisé pour la visualisation de ces structures ainsi que leur minimisation énergétique. Chaque protéine générée par Geno3D a un peptide de 15 alanines placé dans sa poche. Chacun des 9 peptides sélectionnés est positionné dans chaque poche pour les 7 allèles HLA-DRB1 en fonction de leur « core » (d'après l'étude IEDB précédente) en mutant les alanines en fonction de leur position dans la poche. Les complexes HLA-DR-peptides ont ensuite été minimisés jusqu'à atteindre une énergie allant de -600 à -700 kcal/mol, sauf pour l'allèle du HLA-DRB1*0401 où la minimisation n'a pu descendre en dessous de -280 kcal/mol indiquant qu'un problème a eu lieu lors de l'insertion des peptides dans cette protéine HLA. En effet, le logiciel Sybyl-X a permis d'identifier qu'une chaîne d'acides aminés de la protéine s'est visiblement éloignée de la masse protéique, relatant d'une structure 3D faussée. Par manque de temps cet allèle a dû être mis de côté pour la suite de cette thèse. 54 Complexes sont donc disponibles pour la modélisation par dynamique moléculaire.

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le logiciel NAMD pour chacun des complexes HLA-peptide pendant 10ns à une température constante de 300 K, dans une phase aqueuse (elle peut être mimée grâce au logiciel VMD et le modèle d'eau TIP3P).^{195,196} Des analyses de RMSD-2D ont été réalisées avec le logiciel VMD pour chaque complexe. L'analyse RMSD-2D a permis d'extraire 3 conformations clés pour lesquelles le complexe forme une famille de conformères stables. Ce qui fait pour les 54 complexes, un total de 162 conformations de complexe sur lesquelles effectuer la suite de la modélisation.

La stabilité des complexes a ensuite été déterminée par la méthode de l'« alanine scanning ».^{198,199} Le logiciel Rosetta permet de calculer la variation de la variation de l'énergie libre d'interaction ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) de chaque acide aminé du peptide s'il est muté en alanine.²⁰⁰ La contribution de chaque acide aminé est additionnée pour le peptide entier, et une moyenne de toutes ces valeurs est ensuite effectuée pour les trois conformations clés sélectionnées précédemment. Ainsi pour un complexe HLA-peptide une seule valeur moyennant toutes les conformations possibles du $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ est obtenue. Les 54 résultats sont résumés dans le Tableau 12 ci-après. Les peptides présentant un $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ inférieur à -1 kcal/mol pour un allèle de HLA donné ont une forte probabilité d'être effectivement en interaction avec cette molécule HLA lors d'expériences *in vitro*, voire même *in vivo*, si ce peptide est effectivement formé lors de la digestion par une cellule dendritique. Par contre, si le $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ est compris entre -1 et 0 kcal/mol, la possibilité de l'interaction est mise en doute. Et si le $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ est supérieur à 0 kcal/mol alors l'interaction ne peut pas avoir lieu.

Peptide	Allèles HLA-DRB1*					
	0701	1101	1301	0301	1501	0101
LF-15	-5,343	-2,620	-2,273	-3,573	-2,723	-6,197
PT-15	-0,457	-8,980	-1,757	-5,113	-3,033	0,973
LK-15	2,997	5,600	6,953	4,773	3,050	3,623
SF-15	-0,033	3,137	0,137	-1,513	-1,430	-0,127
FS-15	-5,737	-3,133	0,900	-2,193	-6,460	-4,970
VL-15	-2,203	-0,450	-9,100	-7,867	-5,417	-2,217
TG-15	-1,507	3,420	0,270	-2,597	1,453	0,063
VC-15	2,543	1,390	-0,653	2,983	4,983	-0,920
KV-15	-1,300	0,903	5,460	-0,973	-5,107	7,080

Tableau 12 : $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (en kcal/mol) obtenus pour les 9 peptides sélectionnés en fonction de chaque allèle de HLA-DRB1. Sont représentées en vert les valeurs inférieures à -1 kcal/mol, en orange celles comprises entre -1 et 0 kcal/mol, et en rouge celles supérieures à 0 kcal/mol

D'après le Tableau 12, le peptide LF-15 présente des très bons scores de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (inférieurs à -2,2 kcal/mol) avec tous les allèles de HLA testés, il a donc une forte probabilité de répondre positivement aux tests *in vitro*. Par contre le peptide LK-15 présente un résultat de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ supérieur à 2,9 kcal/mol pour tous les allèles de HLA testés. D'après ces résultats ce peptide ne devrait pas pouvoir se fixer dans les poches HLA pour aucun des allèles. Le peptide VC-15 n'est également pas favorable à une bonne accroche mis à part potentiellement pour les allèles 1301 et 0101 des HLA-DRB1, mais un doute subsiste. Les autres peptides ont des résultats de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ mitigés et dépendant de chaque allèle. En conclusion, comme pour la modélisation IEDB, chaque peptide répond différemment vis-à-vis de l'accroche avec les différents allèles des molécules HLA.

3) Conclusion sur la sélection des peptides

La sélection des peptides potentiellement épitopes, à partir des 180 peptides de 15-mers possibles, a pu être simplifiée en utilisant des méthodes de modélisation moléculaire. Deux méthodes ont été utilisées pour réaliser et appuyer la sélection :

- La méthode de modélisation de l'IEDB avec le programme MHC-II-binding qui permet de calculer la probabilité d'accroche entre un peptide et une molécule HLA en fonction de son allèle.
- La méthode de modélisation par simulation de dynamique moléculaire qui permet d'évaluer la stabilité du complexe HLA-peptide en milieu aqueux au cours d'une dynamique moléculaire.

L'utilisation de plusieurs méthodes permet d'additionner les avantages de chaque technique. La méthode de l'IEDB est une technique rapide, l'analyse des données est plus longue, mais elle permet d'éliminer facilement des peptides qui ont de trop faibles probabilités d'accroche pour tous les allèles étudiés. De plus, cette méthode indique la position la plus probable des acides aminés dans la poche. Ce critère est très important compte tenu de l'étude, qui demande qu'un acide aminé spécifique soit orienté vers le récepteur du lymphocyte T. Ce critère a permis d'affiner la première sélection de peptides effectuée, de plus il sera utilisé pour placer correctement les peptides lors de la modélisation par dynamique moléculaire. Pour ce qui est de cette seconde technique mise en œuvre, la phase de préparation des complexes HLA-peptide est très longue, c'est pourquoi les 180 peptides initiaux ne peuvent être tous analysés. De plus les phases de calcul demandent l'accès à un super-ordinateur, et sont également longues ; ainsi que les phases d'analyse des données. Par contre cette technique est très précise. Elle permet de simuler une phase aqueuse et le comportement des complexes HLA-peptide en mouvement dans celle-ci, ce qui est très proche de la réalité et donc très puissant comparé à l'IEDB qui prend en compte des structures statiques issues de modèles cristallins. De plus la technique de l'« alanine scanning » mise en œuvre est une méthode qui s'utilise également sur des modèles enzymatiques *in vitro* pour déterminer l'implication d'un acide aminé dans un site actif.¹⁹⁸ Cette méthode est fiable et rapide à mettre en œuvre.

Au total, à partir des 180 peptides de 15-mers possibles et des 7 allèles des HLA-DRB1 les plus fréquemment rencontrés dans la population caucasienne, les deux méthodes de modélisation moléculaire ont permis de sélectionner 14 peptides potentiellement immunogènes (cf. Tableau 10 p.107). Le Tableau 13 ci-après présente 9 de ces 14 peptides qui ont pu être analysés par les deux méthodes de modélisation sur 6 des 7 allèles les plus fréquents sélectionnés. Pour chacun des 9 peptides, les résultats de la modélisation par dynamique moléculaire sont présentés sur la première ligne, puis les résultats de la modélisation IEDB sont présentés sur les deuxième et troisième lignes avec les percentiles calculés ainsi que les positions qu'a pris la lysine en fonction des « cores » fournis par le programme de l'IEDB. Le code couleur pour les $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ est le même que celui présenté précédemment pour le Tableau 12 (cf. p.110). Pour ce qui est des percentiles, les meilleures valeurs sont celles inférieures à 15 (en vert), celles comprises entre 15 et 31 montrent encore une légère probabilité d'accroche (en orange), par contre les valeurs supérieures à 30 reflètent une trop faible probabilité d'accroche (en rouge). Les positions de la lysine dans la poche des HLA sont représentées par un modèle binaire. Les 1 témoignent d'une bonne orientation de la lysine vers de TcR alors que les 0 désignent une orientation opposée. Les positions flanquantes sont quant à elles symbolisées par des -, et la position 5, préférée pour une bonne présentation, est un 1 bleu et en gras.

Les résultats obtenus pour les deux types de modélisation peuvent donc être comparés. Sur les 54 résultats comparés, seuls 12 (encadrés en rouge) sont en désaccord. En grande partie ce sont les peptides LK-15 et TG-15 qui concordent le moins entre les deux techniques. Et au niveau des allèles,

ce sont les HLA-DRB1*1101 et 1301 qui sont les plus divergents. Il n'y a que pour le complexe HLA-DRB1*0701-TG-15 que le $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ montre une stabilité du complexe alors que le percentile de l'IEDB dénote d'une faible accroche. Les 11 autres désaccords présentent un bon percentile alors que la modélisation par dynamique moléculaire indique une faible stabilisation du complexe (Tableau 13).

Peptide	Allèles HLA-DRB1*						
	0701	1101	1301	0301	1501	0101	
LF-15	-5,343	-2,620	-2,273	-3,573	-2,723	-6,197	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	9,88	1,48	4,25	3,37	11,22	7,30	percentile
	1	1	-	-	1	1	position
PT-15	-0,457	-8,980	-1,757	-5,113	-3,033	0,973	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	13,15	0,63	0,11	7,87	0,98	20,98	percentile
	1	1	1	1	0	0	position
LK-15	2,997	5,600	6,953	4,773	3,050	3,623	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	13,95	7,59	4,25	11,75	67,38	77,04	percentile
	0 / 0 / 1	1 / 0 / 1	0 / 1 / -	0 / 1 / -	0 / 0 / 1	1 / 1 / -	position
SF-15	-0,033	3,137	0,137	-1,513	-1,430	-0,127	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	27,84	19,36	5,90	27,96	30,15	33,84	percentile
	- / 1	1 / 1	- / 1	- / 1	0 / 1	1 / 0	position
FS-15	-5,737	-3,133	0,900	-2,193	-6,460	-4,970	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	3,18	5,58	5,40	18,67	13,33	9,36	percentile
	1	1	1	1	1	1	position
VL-15	-2,203	-0,450	-9,100	-7,867	-5,417	-2,217	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	7,52	0,02	0,17	2,40	2,03	11,24	percentile
	1	0	0	1	1	1	position
TG-15	-1,507	3,420	0,270	-2,597	1,453	0,063	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	48,10	8,13	7,42	5,68	16,33	47,90	percentile
	1	1	1	1	1	1	position
VC-15	2,543	1,390	-0,653	2,983	4,983	-0,920	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	33,690	10,670	15,710	15,150	27,780	65,470	percentile
	0	1	1	1	1	1	position
KV-15	-1,300	0,903	5,460	-0,973	-5,107	7,080	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$
	14,58	11,26	5,90	13,04	18,64	33,13	percentile
	1	1	1	1	0	1	position

Tableau 13 : Résultats de modélisation obtenus pour 9 peptides sur 6 allèles de HLA-DRB1. Pour $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$: sont représentées en vert les valeurs inférieures à -1 kcal/mol, en orange celles comprises entre -1 et 0 kcal/mol, et en rouge celles supérieures à 0 kcal/mol. Pour les percentiles IEDB : sont représentées en vert les valeurs inférieures à 15, en orange celles comprises entre 15 et 31 et en rouge celles supérieures à 31. Pour les positions : le 1 signifie que la lysine est placée en direction du TcR, et plus particulièrement la position 5 si le 1 est en gras et bleu, le 0 signifie qu'elle est dirigée vers le HLA, et le - signifie qu'elle est en zone flanquante. Les résultats encadrés en rouge sont ceux non concordants entre les calculs du $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ et de l'IEDB

Malgré les désaccords entre les deux méthodes, les 14 peptides sélectionnés seront tous synthétisés dans le but de contrôler l'efficacité de nos méthodes de prédiction, voire même de les départager sur les points discordants. La pertinence de la méthode de dynamique moléculaire permet de mettre celle-ci en avant, le peptide LK-15 pourrait alors servir de contrôle négatif en vue de la validation des tests biologiques. Ces derniers, en ne répondant pas pour un seul des peptides modifiés par l'antibiotique ayant des mauvaises prédictions *in silico*, permettent de prouver l'efficacité de la méthode de sélection des peptides ainsi que la sélectivité des tests biologiques. Pour synthétiser ces peptides, la stratégie évaluée comme étant la plus flexible, sélective et économe va être mise en œuvre, c'est-à-dire celle qui passe par la synthèse d'un monomère lysine-pénicilline.

III. Synthèse des monomères

En raison de la synthèse des peptides selon la stratégie Fmoc, les monomères synthétisés devront être de type Fmoc-Lys(pénicilline)-OH. Les pénicillines répondant au même type de mécanisme d'ouverture du cycle β -lactame par les nucléophiles, la même voie de synthèse sera utilisée pour la pénicilline G (**7**) et pour l'amoxicilline (**4**), la différence résidant essentiellement sur le nombre et la nature de groupements réactifs à protéger sur l'antibiotique avant l'ouverture du β -lactame. La synthèse sera mise au point sur la pénicilline G (**7**) puis élargie à l'amoxicilline (**4**).

1) Synthèse du monomère Lys-PG

La stratégie de synthèse envisagée est décrite dans le schéma rétrosynthétique ci-après. Ainsi le monomère (**92**), résultera de la déprotection sélective de l'acide carboxylique du motif lysine et d'une protection de la fonction amine issue du cycle thiazolidine de la pénicilline G. L'ouverture de la pénicilline G (**93**) dont la fonction acide carboxylique aura été protégée, sera réalisée par la lysine (**94**) adéquatement protégée sur son motif amino-acide. Les synthons (**93**) et (**94**) seront préparés au départ des produits commerciaux : la pénicilline G (**7**) sous forme de sel de sodium, et la lysine protégée par un Fmoc sous sa forme acide avec l'amine de sa chaîne latérale soit protégée par un groupement R₄ (**95**), soit non protégée (**96**) (Schéma 39).

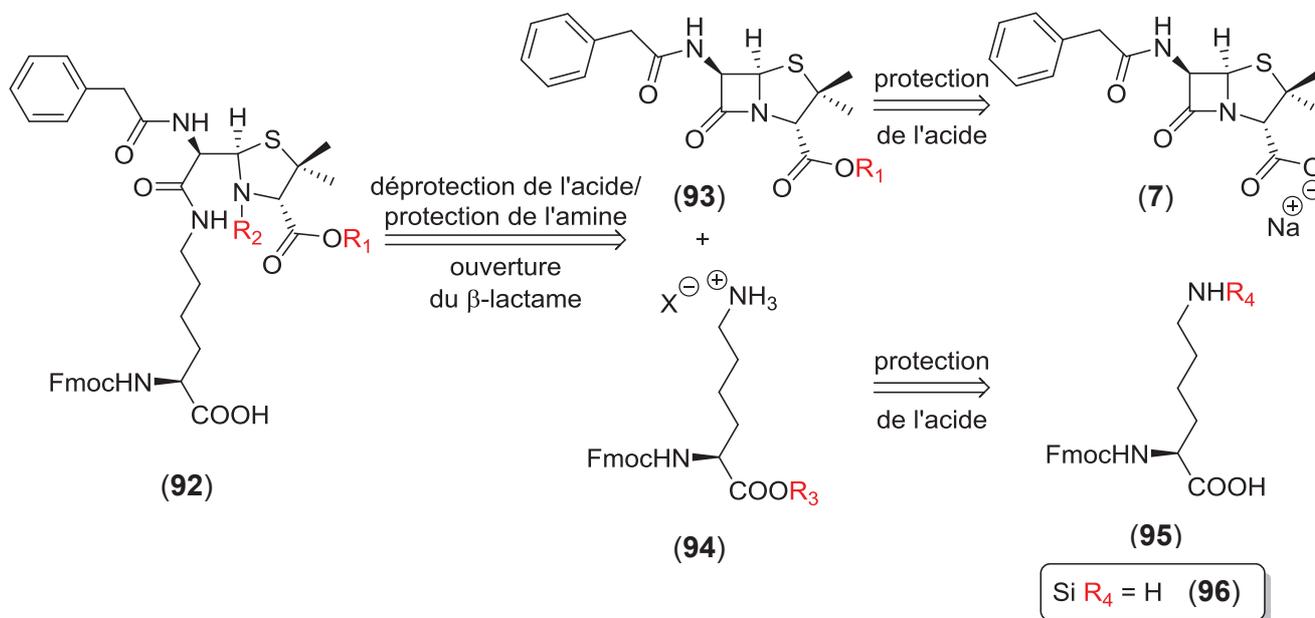


Schéma 39 : Rétrosynthèse du monomère Lys-PG protégé (92)

Afin que le monomère Lys-PG (92) puisse être directement utilisé dans une synthèse de peptide selon une stratégie Fmoc il est indispensable de protéger adéquatement ce dernier en choisissant judicieusement les groupements protecteurs orthogonaux R_1 , R_2 , R_3 et R_4 .

a) Choix des groupements protecteurs

Lors d'une synthèse peptidique selon la stratégie Fmoc un clivage final de tous les groupements protecteurs du peptide se fera en conditions acides. Les deux groupements protecteurs R_1 et R_2 présents sur le monomère final (92) qui sera incorporé dans la synthèse peptidique doivent donc être des groupements acido-labiles, ce qui permettra un clivage de ces groupements en même temps que la déprotection finale du peptide. Par contre ils devront résister aux conditions basiques de clivage du groupement Fmoc lors de la synthèse peptidique, ainsi que celle de clivage du groupement protecteur de l'acide carboxylique de la lysine (R_3). Pour ce qui est de ce dernier, il ne doit donc être ni acido-labile, pour éviter la déprotection de l'acide carboxylique et de l'amine secondaire de la pénicilline G (7) lors de la dernière étape de clivage de R_3 , ni baso-labile pour éviter le clivage du groupement N^2 -Fmoc lors de la dernière étape de la synthèse. A première vue, le type de clivage possible pour le groupement R_3 reste l'hydrogénation catalytique ou un clivage métallo-catalysé.^{224,225}

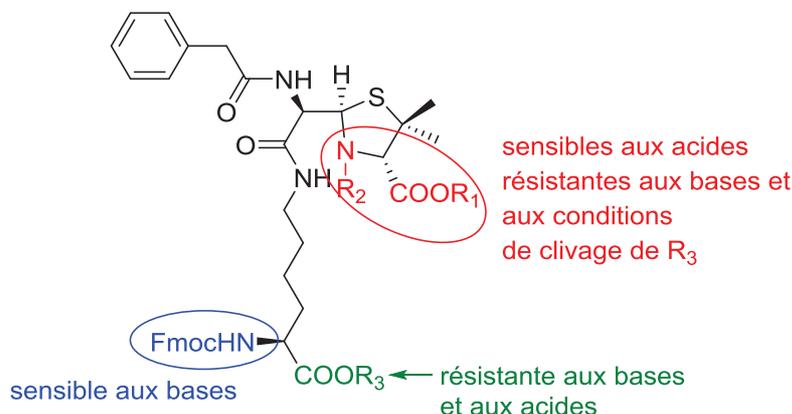


Schéma 40 : Choix des groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Lys(pénicilline G protégée)-OH (92)

Pour le groupement protecteur de l'acide carboxylique de la pénicilline G (7) (R₁) une protection stable en conditions basiques, et labile en conditions acides a été envisagée : l'ester de *tert*-butyle (97). Cette protection est courante, et elle a déjà été mise en pratique sur un β-lactame dans une publication de Stedman. L'acide 7-aminocéphalosporanique (98) est protégé en 7-aminocéphalosporanoate de *tert*-butyle (99) avec un excès d'isobutène, à chaud dans un tube scellé, avec un rendement de 52%.²²⁶

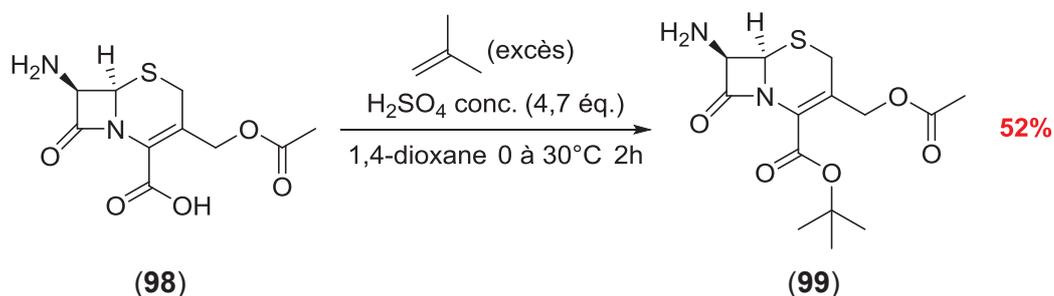
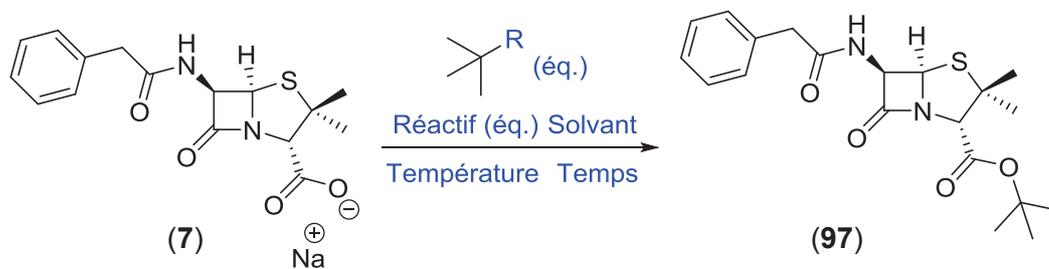


Schéma 41 : Protection de l'acide 7-aminocéphalosporanique (98) en ester de *tert*-butyle (99) d'après Stedman²²⁶

Les mêmes conditions ont donc été appliquées à la pénicilline G (7) mais le groupement *tert*-butyle n'a pas pu être introduit. D'autres conditions plus douces ont alors été testées, en présence de bromure de *tert*-butyle, d'après un mode opératoire de Chevallet où des rendements de l'ordre de 80 à 100% sont atteints, pour des acides aminés *N*-protégés.²²⁷ Malheureusement ces conditions n'ont pas été satisfaisantes pour la pénicilline G (7) (Entrée 1, Tableau 14). Un procédé élaboré par Nahmany *et al.* en conditions neutres, sur des substrats désactivés par des groupements électroattracteurs en α, a alors été expérimenté : la pénicilline G (7) est mise en présence de *tert*-butanol avec un agent de couplage (DCC).²²⁸ Toutefois cette méthode n'a pas mené au produit désiré (97) (Entrée 2, Tableau 14).



Entrée	<i>t</i> -Bu-R (éq.)	Réactif (éq.)	Solvant	Conc.	T°C	Temps
1	-Br (48 éq.)	-	DMAC	0,13 M	55°C	24h
2	-OH (1,25 éq.)	DCC (1 éq.)	DCM	1 M	TA	15 min

Tableau 14 : Tentatives de protection de l'acide carboxylique de la pénicilline G (7) par un groupement *tert*-butyle

L'encombrement généré par le groupement *tert*-butyle ainsi que par le carbone quaternaire en β de la fonction acide est alors mis en cause. Un groupement protecteur moins encombrant est donc envisagé pour la protection de la pénicilline G (7). Une publication de Chow *et al.*, rapporte une protection des pénicillines G (7) et V (14) par un groupement benzyle avec des rendements de 84 et 83% respectivement.²²⁹ Cependant, le groupement benzyle n'est pas acido-labile, ce mode opératoire a donc été adapté au *para*-méthoxybenzyle (PMB). Ce groupement répondant bien aux critères fixés puisqu'il est clivable en milieu acide. L'ester de *para*-méthoxybenzyle de pénicilline G (100) a été obtenu avec succès et à l'échelle du gramme (Schéma 42).

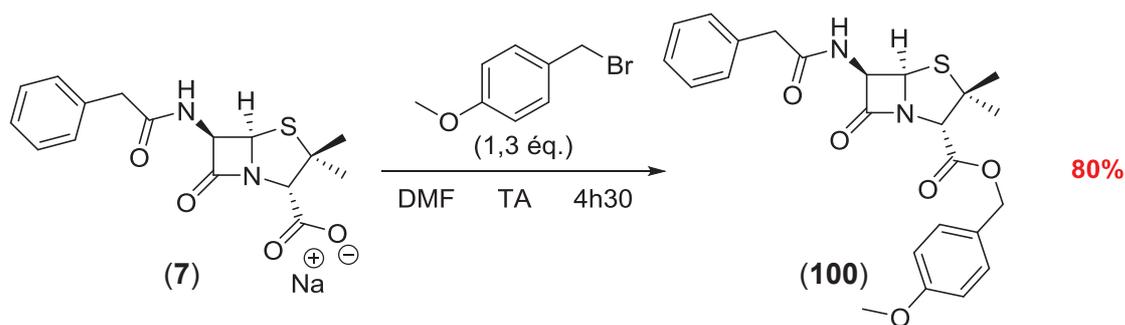


Schéma 42 : Protection de l'acide carboxylique de la pénicilline G (7) en ester de *para*-méthoxybenzyle (100)

Pour ce qui est de la N^2 -Fmoc lysine (96), le groupement protecteur résistant aux acides et aux bases qui a d'abord été envisagé est le groupement allyle. Ce groupement peut être facilement déprotégé dans des conditions douces métallo-catalysées au palladium(0) (formant une liaison π -allyle) ce qui n'atteindra pas le reste de la molécule.²²⁵ Une des techniques les plus simples pour réaliser une estérification en présence d'un alcool avec une petite chaîne carbonée sous forme liquide est de l'utiliser comme solvant et de passer par la formation d'un chlorure d'acide à l'aide d'un

agent chlorant, le plus connu est le chlorure de thionyle. De plus, ce dernier peut être utilisé en excès, ayant un point d'ébullition de seulement 75°C, il est facilement éliminable par évaporation sous pression réduite. Pour les acides aminés, l'une des protections qu'on retrouve souvent dans la littérature est l'ester de méthyle. C'est donc à partir d'un mode opératoire de Granier et ses collaborateurs, de la protection de la Fmoc-Lys-OH (**96**) en Fmoc-Lys-OMe (**101**) avec un rendement de 78%, que la protection en ester d'allyle de *N*²-Fmoc lysine (**102**), a été réalisée.²³⁰ Le produit souhaité (**102**) est obtenu avec un excellent rendement sous la forme d'un chlorure d'ammonium (Schéma 43).

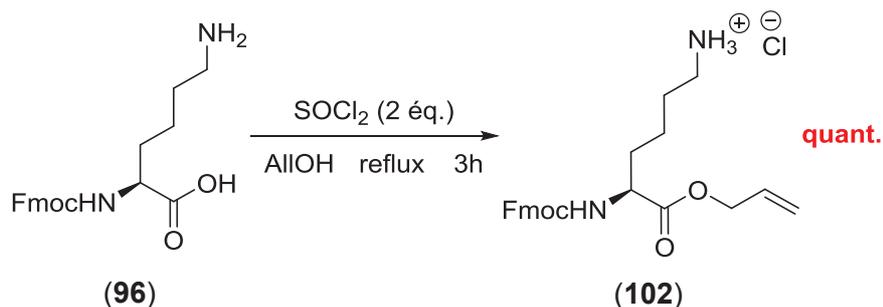


Schéma 43 : Protection de la Fmoc-Lys-OH (**96**) en ester d'allyle (**102**) sous forme de sel de chlorure

En vue de tester d'autres types de groupements protecteurs pour optimiser au mieux l'ouverture de la pénicilline G (**7**), une étude bibliographique, non exhaustive, a été réalisée pour tenter de trouver d'autres groupements protecteurs. Comme spécifié plus haut, la protection en ester de méthyle est la plus simple chimiquement et expérimentalement parlant. Mais les techniques de déprotection impliquent une saponification avec des bases fortes (par exemple LiOH) qui conduiraient à la perte du groupement Fmoc, et parfois même à des racémisations.^{231,232} Cependant certaines méthodes douces pour la déprotection d'ester de méthyle existent. Des enzymes sont capables de reconnaître ce motif, telles que la thermitase, comme présentée dans une publication de Reissmann et Greiner. Cette enzyme est capable d'agir en milieu organique (5% DMSO), et à chaud (55°C). De plus, l'étude réalisée par Reissmann et Greiner met en avant le fait que dans 50% de DMSO l'action protéolytique de l'enzyme est nulle, tandis que son action esterolytique est toujours présente ce qui évite la dégradation des peptides lors de la déprotection. Malgré le milieu légèrement basique, la déprotection des peptides *N*-Fmoc esters de méthyle (**103**) et (**104**) a pu être réalisée avec succès nécessitant 140 et 100 minutes respectivement pour atteindre 90% de formation des produits (**105**) et (**106**) (Schéma 44).²³³

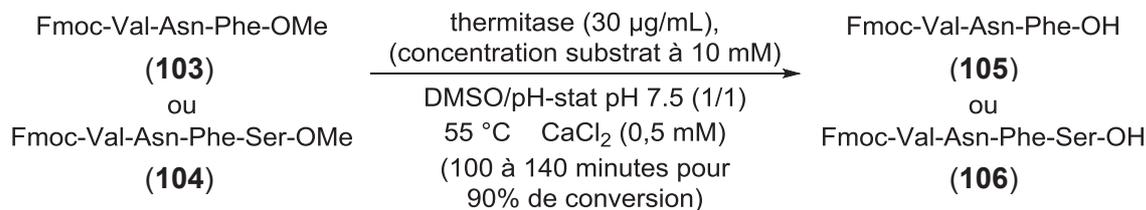


Schéma 44 : Déprotection de l'ester méthylique sur les peptides (103) et (104) à l'aide de la thermitase d'après Reissmann et Greiner²³³

Une autre méthode de déprotection sélective a été décrite dans une publication de Di Gioia *et al.*²³⁴ Un mélange de AlCl₃ et de *N,N*-diméthylaniline (DMA) permet selon le ratio, de déprotéger sélectivement l'ester de méthyle des acides aminés (**107**), menant aux composés *N*-Fmoc sous forme acide (**108**) ou alors de déprotéger le *N*-Fmoc et accéder aux composés *N*-acétyle (**109**) après réaction avec de l'anhydride acétique (Schéma 45).

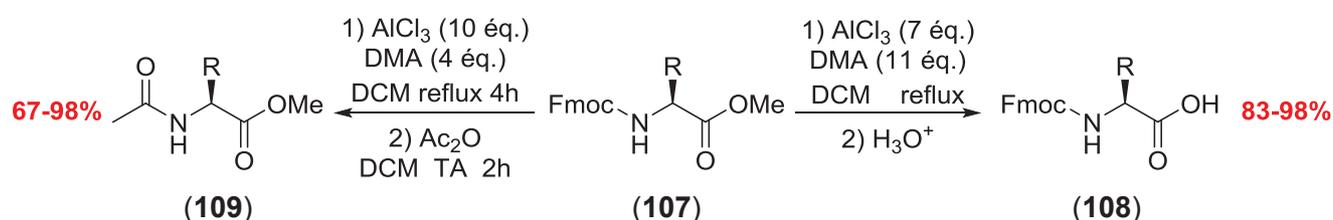


Schéma 45 : Déprotection sélective du groupement méthyle ou 9-fluorénylméthoxycarbonyl sur des acides aminés (107) en fonction de la proportion AlCl₃/*N,N*-diméthylaniline (DMA) d'après la publication de Di Gioia et ses collaborateurs²³⁴

L'espèce active formée lors de la réaction entre le trichlorure d'aluminium et la *N,N*-diméthylaniline est le complexe (**110**), présenté au Schéma 46 ci-après. Lorsque la DMA est introduite en défaut, elle est entièrement consommée pour former le complexe (**110**). Par contre, le trichlorure d'aluminium n'ayant pas servi à la formation du complexe (**110**) viendra se chélater au site le plus basique, à savoir l'atome d'oxygène de la fonction carbamate. La déprotection du groupement Fmoc aura alors lieu. A l'inverse si c'est le trichlorure d'aluminium qui est introduit en défaut, il sera entièrement consommé à la formation du complexe (**110**), et c'est ce dernier qui agit comme un acide de Lewis plus encombré, qui ne pourra donc pas se chélater au carbamate de 9-fluorénylméthyle. Il agira uniquement sur la fonction ester et induira le clivage du groupement méthyle. Mécanistiquement, les auteurs supposent ne pas être en présence d'un cation méthyle qui serait capté par la DMA, mais plutôt d'être en présence d'un mécanisme de S_N2 désalkylante par la DMA sur l'ester de méthyle activé par le complexe (**110**).

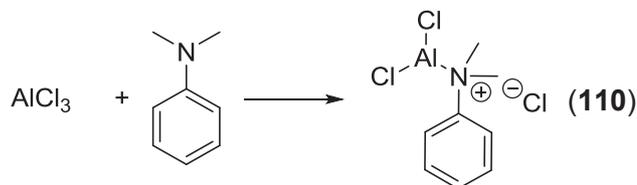
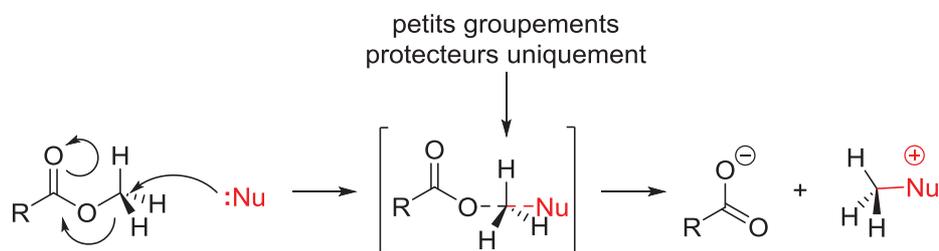


Schéma 46 : Formation de l'espèce active entre AlCl_3 et la DMA d'après Di Gioia et al.²³⁴

L'inconvénient de cette technique réside dans le fait que le trichlorure d'aluminium en présence d'un excès d'un composé aromatique, de type *N,N*-diméthylaniline ou anisole, est également connu pour déprotéger des esters de *para*-méthoxybenzyle.²³⁵ De plus, les groupements protecteurs des amines tels que les carbamates de *para*-méthoxybenzyle (Moz), de *tert*-butyle (Boc) et de benzyle (Cbz) sont également touchés par ces conditions de clivage.^{235,236}

Cette méthode de déprotection ne sera donc pas considérée de par la possibilité de perdre le groupement protecteur de l'acide carboxylique de la pénicilline G (7) (PMB). De plus, le choix du groupement protecteur R_2 de l'amine secondaire formée lors de l'ouverture du cycle β -lactame serait trop restreint si cette technique de déprotection était choisie.

Une autre méthode douce employée pour déprotéger sélectivement les esters peu encombrés tels que ceux de méthyle ou d'éthyle consiste à réaliser une $\text{S}_{\text{N}}2$ désalkylante avec des nucléophiles anioniques ou neutres tels que ceux présentés en Schéma 47.²³⁷⁻²³⁹



:Nu (Anioniques ou Neutres) = I^- , Cl^- , $t\text{-BuO}^-$, CN^- , NCS^- , RS^- ou RSH , R_2NH , DBN, DBU

Schéma 47 : Mécanisme de la $\text{S}_{\text{N}}2$ désalkylante et les types de nucléophiles possibles, un petit groupement protecteur est nécessaire à la formation de l'intermédiaire à 5 centres

Les nucléophiles puissants tels que CN^- , I^- ou RS^- sont préférés et en particulier les ions I^- sont ceux les plus souvent utilisés.²³⁷⁻²³⁹ Un exemple de Biron et Kessler publié en 2005 relate de la déprotection par une $\text{S}_{\text{N}}2$ désalkylante avec LiI des acides aminés N^2 -méthylés et protégés par un groupement *ortho*-nitrobenzènesulfonyl (111) (Schéma 48).²⁴⁰ Les rendements sont très bons et vont de 83 à 99% (excepté pour une cystéine et une histidine respectivement *S*- et *N*-trityle pour lesquelles les rendements sont de 35 et 33%, la fragilité du groupement trityle étant mise en cause dans la publication). La sélectivité de la méthode par rapport aux esters et éthers de *tert*-butyle ainsi que les carbamates de benzyle et de *tert*-butyle est également démontrée dans cette publication.²⁴⁰

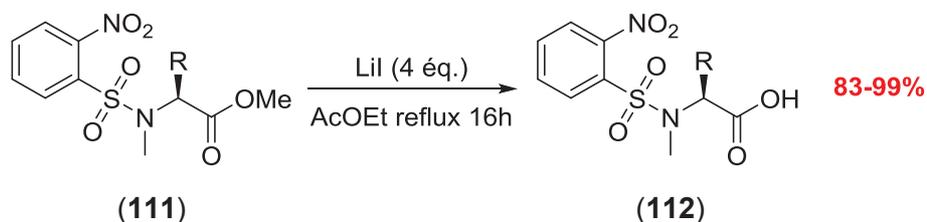


Schéma 48 : S_N2 désalkylante sur les acides aminés (111) avec Lil d'après une publication de Biron et Kessler²⁴⁰

Au vu de cette méthode de déprotection sélective, la protection de la *N*-Fmoc lysine (**96**) a donc également été réalisée avec le groupement méthyle. Les conditions mises en œuvre sont les mêmes que pour la protection en allyle (*cf.* Schéma 43 p.117),²³⁰ mais dans du méthanol au lieu de l'alcool allylique. Le composé protégé sous forme d'ester de méthyle (**101**) est également obtenu avec un rendement quantitatif.

Un troisième groupement protecteur a par la suite été envisagé : le 2-(triméthylsilyl)éthyle (TMSE). Les méthodes de déprotection les plus connues de l'ester de TMSE sont l'utilisation des fluorures ou des acides.^{225,241} Ces deux techniques ne répondent pas aux critères fixés, le groupement Fmoc étant sensible aux fluorures,²⁴² et les groupements R_1 et R_2 sur la pénicilline, sensibles aux acides. Cependant, il existe des méthodes moins connues qui permettent une déprotection sélective de l'ester de TMSE. Par exemple une méthode utilisant une enzyme : l'Alcalase-CLEA (cross-linked enzyme aggregates) présentée par Nuijens et ses collaborateurs.²⁴³ Cette enzyme est sélective non pas du substrat, mais de la chaîne principale des acides aminés, et permet des déprotections d'une variété d'esters d'acides aminés (**113**) avec des très bons taux de conversions et rendements (Schéma 49). Les produits (**114**) obtenus montrent que les groupements protecteurs des amines tels que les carbamates de benzyle, de *tert*-butyle ou de 9-fluorénylméthyle ne sont pas touchés par la déprotection. De même les groupements protecteurs des acides ne sont pas atteints s'ils ne sont pas placés sur la chaîne principale du peptide (Tableau 15).

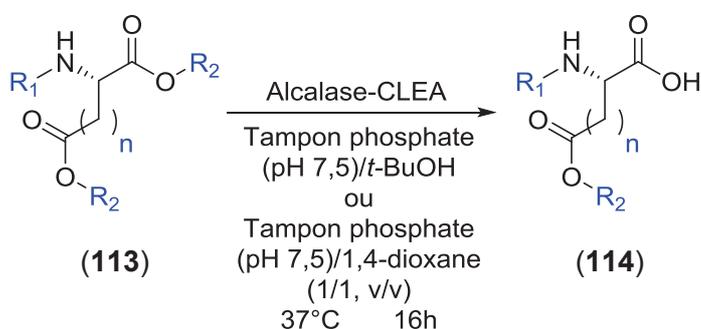


Schéma 49 : Déprotection sélective des esters de la chaîne principale des acides aminés (113) par l'Alcalase-CLEA d'après Nuijens *et al.*²⁴³

N°	n	Acide aminé	R ₁	R ₂	Conversion	Rdt
a	1	Asp	Cbz	All	96%	87%
b	2	Glu	Cbz	All	97%	85%
c	1	Asp	Boc	All	98%	87%
d	2	Glu	Boc	All	98%	86%
e	1	Asp	Fmoc	All	95%	77%
f	2	Glu	Fmoc	All	97%	78%
g	1	Asp	Cbz	TMSE	95%	85%
h	1	Asp	Fmoc	PTMSE	96%	N.C.

Tableau 15 : Différents substrats (113) sujets à la déprotection à l'Alcalase-CLEA d'après Nuijens *et al.*²⁴³

Une autre déprotection des esters de TMSE est une méthode utilisant le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Testée en premier lieu sur des éthers, elle est également fonctionnelle sur des esters, comme le montre Taylor *et al.* dans une publication de 2006.²⁴⁴ Le pentasaccharide (115) est sélectivement déprotégé de ses éther et ester de TMSE par l'action du $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, suivie d'une chromatographie sur silice avec un solvant très polaire qui permet de re-protonner les espèces et de donner le composé (116) avec un très bon rendement (Schéma 50).

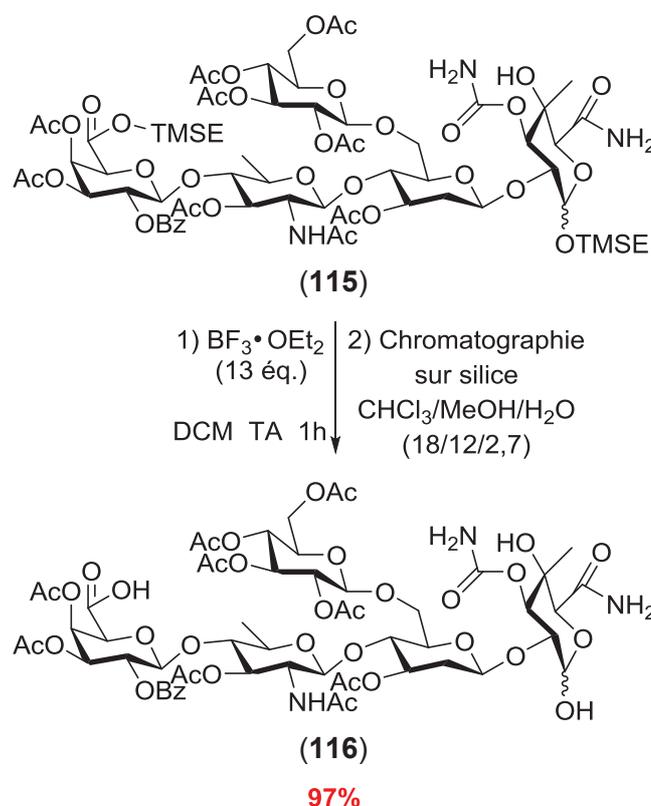


Schéma 50 : Déprotection sélective des ester et éther de TMSE du pentasaccharide (115) d'après Taylor *et al.*²⁴⁴

Le mécanisme mis en jeu est une β -élimination qui a été décrite par Jansson et ses collaborateurs en 1988 sur l'alcool porté par le carbone anomérique de sucres.²⁴⁵ Le trifluorure de bore va dans un premier lieu chélater l'oxygène porté par le carbone anomérique, un de ses fluors va alors servir de nucléophile pour attaquer le silyle et permettre la β -élimination avec le dégagement d'éthylène gazeux. L'espèce déprotégée est donc sous la forme $-\text{O}-\text{BF}_2$, qui est facilement hydrolysable pour mener au composé déprotégé sous forme $-\text{OH}$ (Schéma 51).



Schéma 51 : Mécanisme de clivage du groupement TMSE par le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ postulé par Jansson *et al.*²⁴⁵

Cependant, le groupement Fmoc est également la cible des acides de Lewis. Néanmoins l'équipe de Motiei et ses collaborateurs décrit le couplage entre le sucre (117) et la Fmoc-Ser-OAll (118) par $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, menant au produit (119) avec un bon rendement et sans provoquer la perte du groupement Fmoc (Schéma 52).²⁴⁶

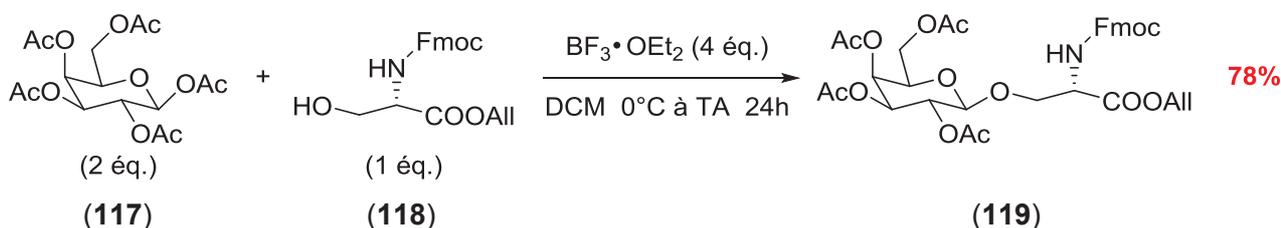


Schéma 52 : Couplage entre le sucre (117) et la Fmoc-Ser-OAll (118) en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ sans provoquer le clivage du groupement Fmoc d'après Motiei *et al.*²⁴⁶

Les conditions de déprotection au $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ sont donc compatibles avec l'utilisation d'un groupement protecteur Fmoc. La synthèse de la lysine protégée par le groupement TMSE a donc été envisagée. L'alcool 2-(triméthylsilyl)éthanol n'est pas un bon candidat pour être à la fois réactif et solvant, il sera donc introduit en quantité stœchiométrique, laissant l'opportunité à l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine d'attaquer le carbonyle activé et de cycliser le produit de départ. Cette amine devra donc être protégée. Le groupement protecteur choisi ne doit pas nécessiter un clivage en milieu basique pour ne pas toucher le Fmoc, ni en milieu acide pour préserver le TMSE. Les groupements les plus communs répondant à ces critères sont : le carbamate de benzyle (Cbz) et le carbamate d'allyle (Alloc). Le produit de départ choisi est la N^2 -Fmoc N^6 -Cbz lysine (120) commerciale.

La synthèse de la lysine protégée s'effectue donc en deux étapes : la première est la formation de l'ester (**121**) en passant par un chlorure d'acide formé par action du chlorure de thionyle sur l'acide carboxylique de la lysine (**120**). La seconde consiste en l'hydrogénolyse du carbamate de benzyle protégeant l'amine de la chaîne latérale de la lysine. Cette deuxième étape permet alors de choisir quel sera le contre ion du sel formé, ce qui peut être un avantage étant donné que le contre ion peut jouer un rôle dans la réaction d'ouverture de par l'équilibre entre les formes $-NH_2$ et $-NH_3^+$ de la lysine. L'influence de sels d'acides minéraux et organiques pourra donc être évaluée. Deux produits ont été préparés avec des bons rendements globaux sur les deux étapes de 82% pour la formation du chlorure d'ammonium (**122**) et de 85% pour l'acétate d'ammonium (**123**) (Schéma 53).

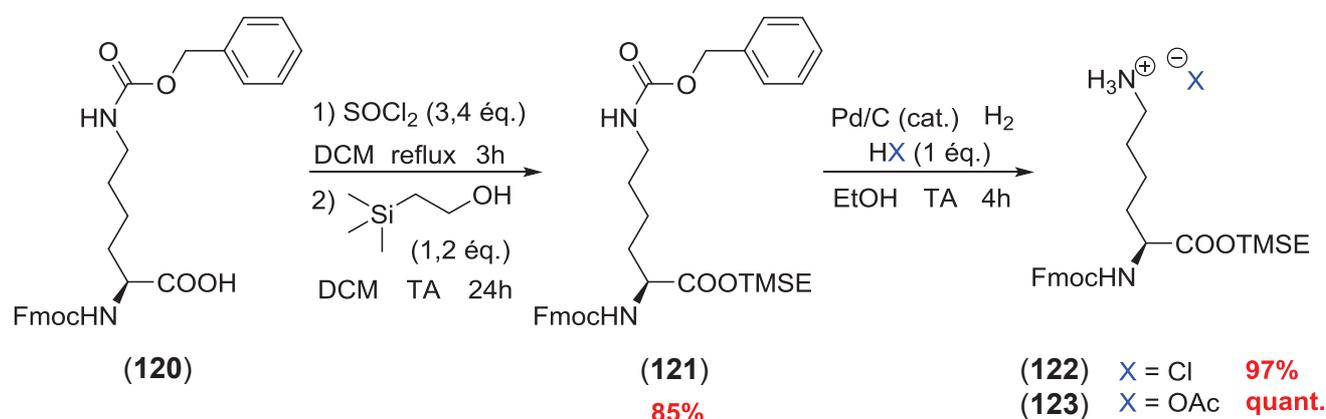


Schéma 53 : Protection de la Fmoc-Lys(Z)-OH (120**) en ester de TMSE sous forme de sel de chlorure (**122**) et de sel d'acétate (**123**) en deux étapes**

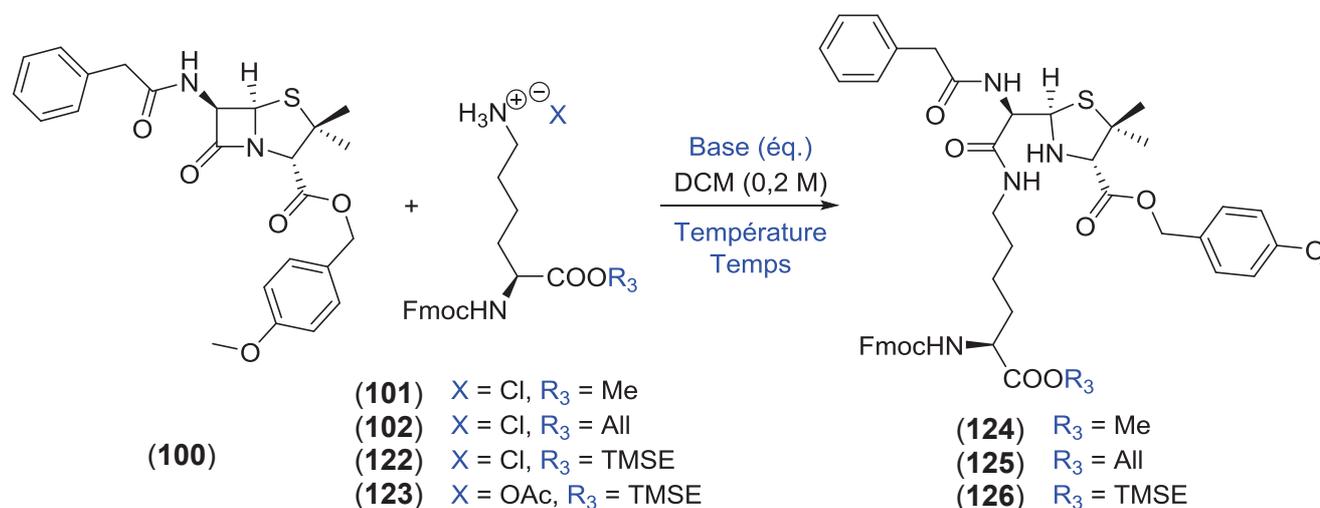
En conclusion, mis à part le groupement *tert*-butyle qui n'a pas pu être introduit sur la pénicilline G (**7**), les fonctions acides carboxyliques des lysines (**96**) et (**120**) et celle de la pénicilline G (**7**) ont été protégées, sous forme d'ester, avec de très bons rendements allant de 80% à des rendements quantitatifs. Une fois le choix des groupements protecteurs judicieusement effectué et les composés synthétisés, la mise au point de l'étape clé peut être entreprise : l'ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline G protégée en ester de *para*-méthoxybenzyle (**100**) par les différentes lysines sous forme de sel de chlorure, protégées en ester de méthyle (**101**), d'allyle (**102**) ou de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**122**) ou sous forme de sel d'acétate en ester de TMSE (**123**).

b) Ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline G par des lysines

Le point délicat de l'étape d'ouverture du β -lactame par les lysines est la basicité de la fonction amine distale et l'utilisation du groupement protecteur N^2 -Fmoc sur l'amine proximale. En effet, il a déjà été rapporté dans la littérature que la lysine sous sa forme N^6 - NH_2 est capable de cliver le groupement N^2 -Fmoc protégeant sa chaîne principale.²⁴⁷ Ayant les 4 lysines protégées (**101**), (**102**), (**122**) et (**123**) sous forme de sel d'ammonium, l'élément incontournable de cette étape sera

l'introduction d'une base pour libérer l'amine de la chaîne latérale de la lysine sous sa forme N^6 -NH₂ réactive. Le pKa de cette amine est situé autour de 10, la base choisie devra donc être forte. Elle sera alors capable de générer un clivage compétitif du groupement N^2 -Fmoc sur l'amine de la chaîne principale de la lysine.²⁴² Plusieurs conditions ont donc été évaluées dans le but de limiter la déprotection du groupement Fmoc et d'augmenter la conversion en faveur de l'ouverture du β -lactame (Tableau 16). Pour libérer l'amine distale, deux bases ont été testées, le carbonate de potassium, base inorganique insoluble en milieu organique, et la diisopropyléthylamine (DIEA), base organique encombrée soluble en milieu organique. Dans le cas du K₂CO₃, la lysine est dans un premier temps prétraitée par ce dernier, puis après filtration de la base, elle est introduite sous sa forme N^6 -NH₂ dans le milieu réactionnel en présence de la pénicilline protégée (**100**). Dans le cas de la DIEA, soluble dans le milieu, elle est directement introduite dans le mélange de sel de lysine (**101**) et de pénicilline (**100**). Les rendements s'avèrent moins bons en présence de K₂CO₃ : après 20h de réaction à température ambiante, le produit ester de méthyle (**124**) est obtenu avec un rendement quasiment identique à celui obtenu avec de la DIEA après seulement 7h (Entrées 1 et 2, Tableau 16). La DIEA étant une base encombrée, elle libère moins rapidement l'amine distale de la lysine que lors du prétraitement au K₂CO₃ de cette dernière. Il est donc conclu qu'en présence d'une grande quantité d'amine libre dans le milieu réactionnel, la compétition entre le clivage du groupement Fmoc et l'ouverture du β -lactame de la pénicilline penche en faveur du clivage. L'amine de la chaîne latérale de la lysine doit donc être libérée lentement. Par ailleurs, en plus de l'utilisation de la DIEA, l'augmentation de la température de réaction permet d'améliorer la vitesse d'ouverture du β -lactame. Ainsi, quand le milieu réactionnel est porté à reflux, le temps de la réaction est abaissé à 4h et permet une légère amélioration du rendement (Entrée 3, Tableau 16). Pour ralentir la libération de l'amine base, et de ce fait la déprotection de l'amine de la chaîne principale de la lysine, une addition plus lente de la DIEA a été testée. Pour ce faire, un équivalent de DIEA a été introduit en trois portions dans le milieu réactionnel, toutes les heures. Pour le produit ester de méthyle (**124**), le rendement est augmenté à 54% (Entrée 4, Tableau 16). Ces mêmes conditions ont donc été reproduites pour les ouvertures avec les esters d'allyle (**102**) et de TMSE (**122**), mais les rendements sont plus modestes comparés à l'ester de méthyle (**124**) (Entrées 5 et 6, Tableau 16), exception faite du produit (**126**), résultant de l'ouverture de la pénicilline (**100**) avec l'ester de TMSE sous forme de sel d'acétate (**123**), qui présente un bon rendement de 56% (Entrée 7, Tableau 16). Ce meilleur résultat par rapport à l'utilisation du sel de chlorure (**122**) est explicable par l'équilibre existant entre les formes amine libre -NH₂ et ammonium -NH₃⁺ pour un sel d'acétate d'ammonium. L'optimisation des conditions d'ouverture avec l'ester d'allyle sous forme de sel de chlorure (**102**) est passée par la modification des proportions des réactifs : pour être en défaut de lysine et de base, la pénicilline (**100**) est introduite en excès, ou en quantité quasiment stœchiométrique. Cependant, les proportions lysine/DIEA/pénicilline influencent peu l'efficacité de la réaction (Entrées 5, 8 et 9, Tableau 16). Pour optimiser au mieux la réaction, l'addition de la base a donc été encore ralentie : l'addition de la DIEA en continu *via* l'utilisation d'un pousse-seringue a permis d'augmenter le rendement d'ouverture (Entrées 9 et 10, Tableau 16). Le temps de l'addition a alors été augmenté et un meilleur rendement

de 49% est obtenu pour une addition en 4h30 suivie d'une heure de réaction (Entrée 11, Tableau 16). Néanmoins, un temps prolongé d'addition de la DIEA favorise la perte du groupement Fmoc et diminue alors le rendement d'ouverture (Entrée 12, Tableau 16).



Entrée	Lys	R ₃	Eq. PG/Lys	Base (éq.)	Addition de la base	T°C	Temps	Rdt
1	(101)	Me	1/1,5	pré-traitement Lys au K ₂ CO ₃	-	TA	20h	28%
2	(101)	Me	1/1,5	DIEA (1,5 éq.)	en une fois	TA	7h	25%
3	(101)	Me	1/1,5	DIEA (1,5 éq.)	en une fois	reflux	4h	31%
4	(101)	Me	1/1,5	DIEA (1,5 éq.)	en trois fois	reflux	4h	54%
5	(102)	All	1/1,5	DIEA (1,5 éq.)	en trois fois	reflux	4h	35%
6	(122)	TMSE	1/1,5	DIEA (1,5 éq.)	en trois fois	reflux	4h	38%
7	(123)	TMSE	1/1,2	DIEA (1,2 éq.)	en trois fois	reflux	4h	56%
8	(102)	All	1,5/1	DIEA (1,1 éq.)	en trois fois	reflux	4h	30%
9	(102)	All	1,1/1	DIEA (1,1 éq.)	en trois fois	reflux	4h	32%
10	(102)	All	1,1/1	DIEA (1,1 éq.)	en continu	reflux	4h	38%
11	(102)	All	1,1/1	DIEA (1,1 éq.)	en continu	reflux	5h30	49%
12	(102)	All	1,1/1	DIEA (1,1 éq.)	en continu	reflux	9h	46%

Tableau 16 : Différentes conditions testées en vue de l'optimisation de l'ouverture du cycle β-lactame de la pénicilline G protégée en ester de PMB (100) par différentes N-Fmoc lysines protégées (101), (102), (122) et (123)

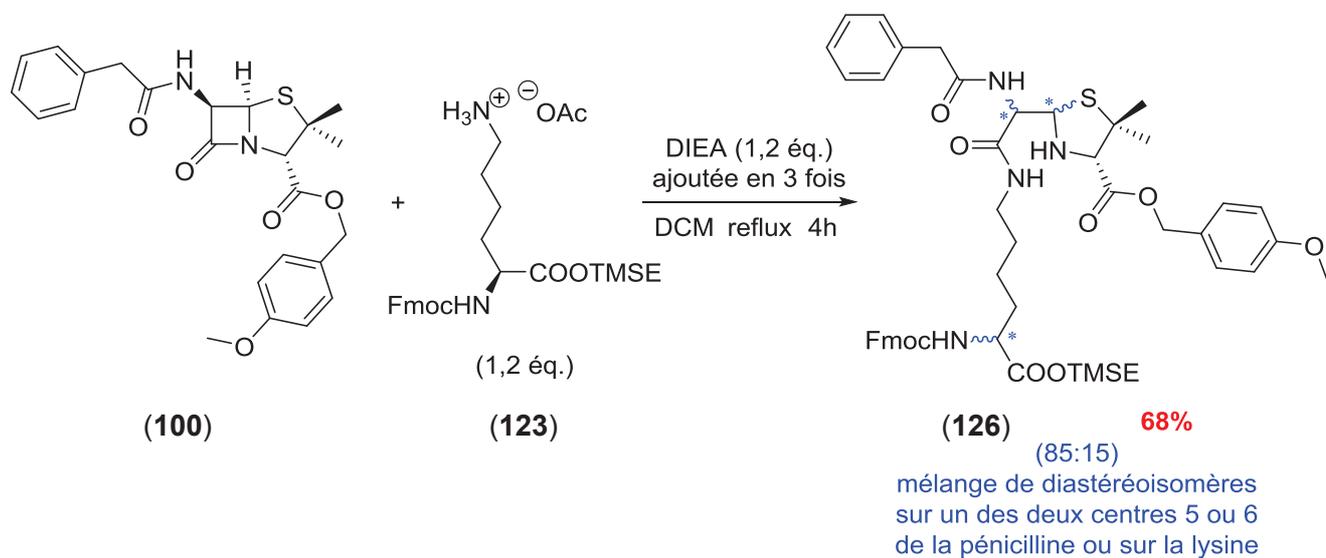
En conclusion les meilleurs rendements en produits de couplage Lys-PG sont de 54% pour le produit ester de méthyle (**124**), 49% pour le produit ester d'allyle (**125**) et 56% pour le produit ester de TMSE (**126**).

Après les bons résultats obtenus avec le sel d'acétate de lysine (**123**), des essais de conversion du sel de chlorure de l'ester d'allyle (**102**) en sel d'acétate ont été expérimentés. La synthèse en deux étapes au départ de la lysine *N*⁶-Cbz (**120**) reproduisant les conditions d'obtention de l'ester de TMSE (**123**) (cf. Schéma 53 p.123) ne sont pas applicables à ce substrat de par sa fonction allyle, sensible aux réductions catalytiques. Le chlorhydrate de lysine (**102**) est donc filtré sur du Na₂CO₃ solide dans une solution d'acide acétique à 2 M dans du méthanol, ou bien il est traité par une solution de nitrate d'argent dans de l'acide acétique, ou encore par une solution d'acétate de sodium en vue de la précipitation du chlorure de sodium mais sans succès.

Au cours des études d'ouverture du β-lactame, une attention particulière a été portée aux possibles épimérisations des deux centres sensibles en position C5 et C6 de la pénicilline. En règle générale les produits obtenus sont énantiomériquement purs, sauf pour l'ester de TMSE (**126**) qui a été obtenu une seule fois en mélange diastéréomérique. Cette réaction a donc été étudiée plus en détail pour tenter de déterminer le centre épimérisé.

c) Etude de l'épimérisation de la pénicilline G en solution

La formation des épimères a été observée lors de l'utilisation de la lysine ester de TMSE sous forme de sel d'acétate (**123**) et d'1,2 équivalent de DIEA, ajoutée en trois portions, dans du dichlorométhane porté à reflux pendant 4h. Lors de cet essai, le rendement obtenu était de 68%, soit bien supérieur à ceux généralement obtenus pour ces réactions d'ouverture. Le mélange de diastéréoisomères a été analysé en chromatographie HPLC, et un ratio de 85:15 entre les deux diastéréoisomères a été déterminé (Schéma 54). Sont potentiellement épimérisables sur ce composé (**126**) : le centre stéréogène de la lysine,^{248,249} et les centres C5 et C6 du motif pénicilline. Cependant, d'après la littérature, le centre 5 est plus enclin à une rétention de configuration imposée par la compression stérique liée au cycle thiazolidine.¹⁰³ La raison pour laquelle une épimérisation associée à une augmentation du rendement en produit de couplage a été observée une seule fois dans ces conditions reste cependant inexpliquée.



Sch\u00e9ma 54 : R\u00e9action ayant men\u00e9e \u00e0 l'obtention d'un m\u00e9lange de deux diast\u00e9roisom\u00e8res du produit (126)

L'\u00e9pim\u00e9risation est \u00e9galement observable en RMN du proton : sur les spectres, le doublet \u00e0 5,54 ppm int\u00e9grant pour 1 proton, repr\u00e9sente le proton port\u00e9 par une des deux amines secondaires de la mol\u00e9cule (126) n'ayant qu'un seul voisin. C'est-\u00e0-dire l'amine de la cha\u00eene principale de la lysine, ou l'amine situ\u00e9e sur le centre 6 de la p\u00e9nicilline.

La Figure 26 ci-apr\u00e8s compare la zone situ\u00e9e entre 5,38 et 5,68 ppm des spectres RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) des produits (126), en m\u00e9lange diast\u00e9rom\u00e9rique avec un ratio de 85:15 et non \u00e9pim\u00e9ris\u00e9.

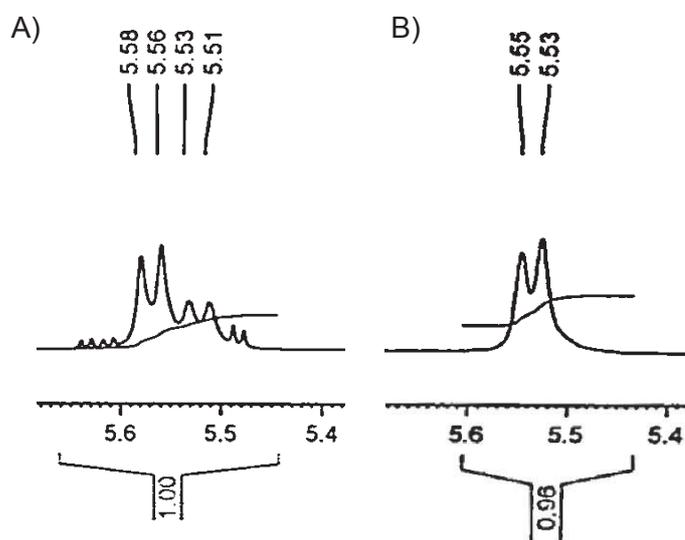


Figure 26 : Observation du centre \u00e9pim\u00e9ris\u00e9 du produit ouvert prot\u00e9g\u00e9 en ester de TMSE (126) par RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) sur le signal \u00e0 5,54 ppm (A) compar\u00e9 au signal obtenu quand le compos\u00e9 (126) est \u00e9nantio\u00e9riquement pur (B)

La superposition des autres signaux du spectre RMN ^1H obtenu pour le mélange de diastéréoisomères ne permet pas l'identification du centre épimérisé. Ainsi, ces deux diastéréoisomères ont été séparés par HPLC préparative. Le diastéréoisomère majoritaire a été caractérisé en RMN ^1H et ^{13}C , conduisant à l'identification du composé (**126**) présentant une rétention de la configuration de la pénicilline G (**7**) naturelle (Figure 27).

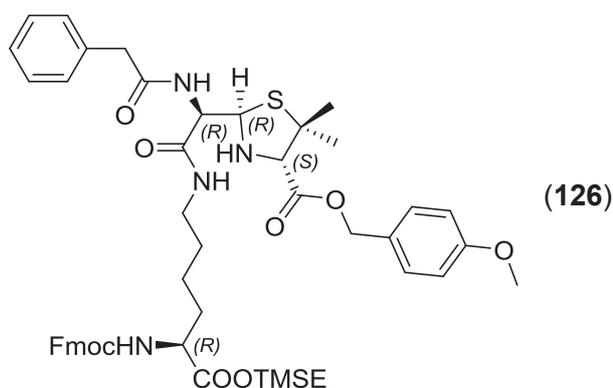


Figure 27 : Représentation du diastéréoisomère majoritaire du produit (**126**), isolé et caractérisé du mélange épimérisé

Par contre les quantités du diastéréoisomère minoritaire sont trop faibles pour permettre l'élucidation de sa structure tridimensionnelle par RMN, quelles que soient les conditions de solvant, de champs et de techniques (microsonde) utilisées.

Une stratégie alternative a alors été étudiée pour tenter d'élucider le centre épimérisé. Il a été choisi d'ouvrir la pénicilline (**100**) par un analogue de la lysine (**123**) dépourvu de centre asymétrique, le 6-aminohexanoate de TMSE (**128**). Un des avantages de cette stratégie est qu'elle permettrait une simplification des spectres RMN. Pour obtenir le produit (**127**), la pénicilline protégée en ester de PMB (**100**) sera ouverte par l'hexanoate (**128**), lui-même obtenu par l'estérification de l'acide 6-aminohexanoïque (**129**) (Schéma 55). Si le produit (**127**) est obtenu en mélange diastéréomérique, l'épimérisation du centre 6 du motif pénicilline sera confirmée.

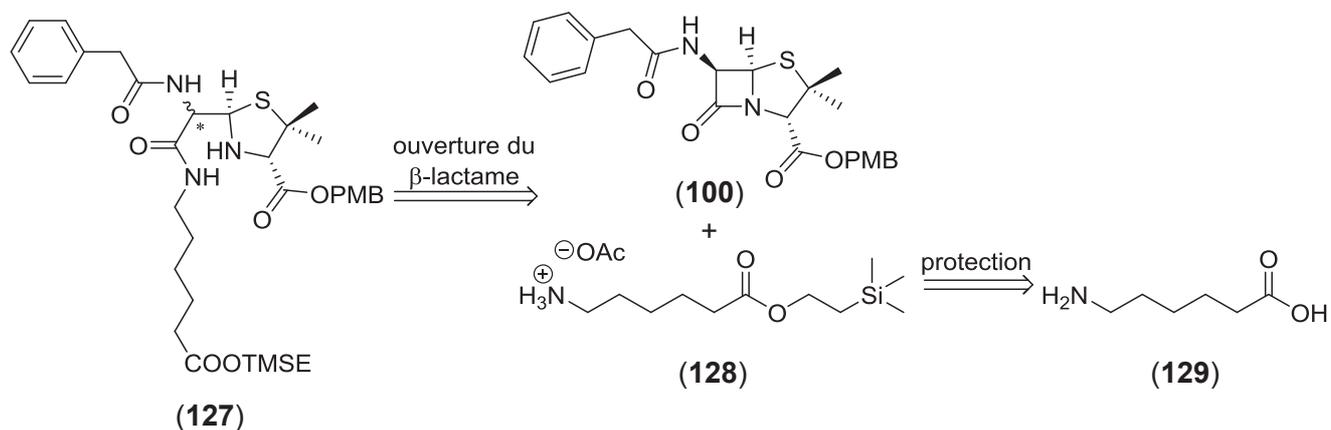


Schéma 55 : Rétrosynthèse du composé (**127**)

Pour estérifier l'acide 6-aminohexanoïque (**129**) par le (triméthylsilyl)éthanol, l'acide doit être activé. Il est donc nécessaire de préalablement protéger l'amine pour éviter la lactamisation de la molécule. La première étape a donc consisté en la protection de l'amine primaire. De manière similaire à la synthèse de la lysine (**123**), la fonction amine est protégée par un carbamate de benzyle selon le mode opératoire décrit par Schmuck *et al.*²⁵⁰ Le carbamate (**130**) est obtenu avec un rendement de 96% puis est directement engagé dans la seconde étape sans purification. L'estérification est réalisée dans les conditions décrites par Gu et ses collaborateurs, en présence de DCC et d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP).²⁵¹ L'ester (**131**) est obtenu avec un très bon rendement de 84% en seulement 2h. La dernière étape de déprotection de l'amine est exécutée également selon le protocole de Schmuck et ses collaborateurs.²⁵⁰ Bien qu'efficace sur le 6-benzyloxycarbonylaminohexanoate de *tert*-butyle, l'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon dans du THF laisse l'ester de TMSE (**128**) inchangé (Entrée 1, Tableau 17). Dans une publication de Sajiki, l'hydrogénolyse du groupement carbamate de benzyle sur des *N*-Cbz sérine ou thréonine dans du méthanol à température ambiante conduit au produit déprotégé en 30 minutes avec des rendements quantitatifs.²⁵² De plus, avec cette même méthode, Gu et ses collaborateurs déprotègent la Fmoc-Lys(Z)-OTMSE (**121**) en 3 heures avec 80% de rendement.²⁵¹ Cependant, au départ de notre substrat (**131**) cette méthode ne conduit pas au produit escompté (**128**) et le produit de départ est récupéré inchangé (Entrée 2, Tableau 17). Seule l'utilisation du catalyseur de Pearlman donne le produit déprotégé (**128**) avec un rendement quantitatif (Entrée 3, Tableau 17). En conclusion, le composé (**128**) a été synthétisé en 3 étapes à partir de l'acide 6-aminohexanoïque (**129**) avec un rendement global de 81% (Schéma 56).

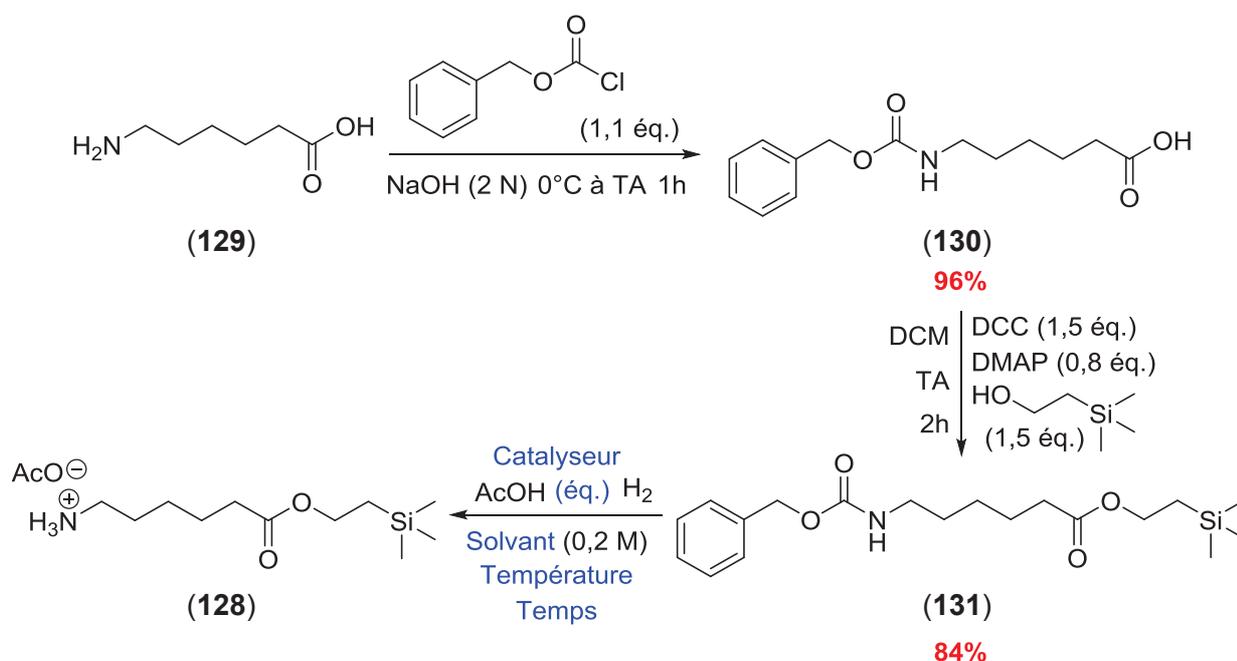


Schéma 56 : Synthèse du sel d'acétate de 6-aminohexanoate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**128**) à partir de l'acide 6-aminohexanoïque (**129**)

Entrée	Eq. AcOH	Catalyseur	Solvant	T°C	Temps	Rdt
1	1 éq.	Pd/C	THF	40°C	6h	récupération du produit de départ
2	1 éq.	Pd/C	MeOH	TA	24h	récupération du produit de départ
3	2 éq.	Pd(OH) ₂ /C	MeOH	TA	5h	quant.

Tableau 17 : Différentes conditions utilisées pour l'hydrogénolyse catalytique du produit (131) en (128)

L'ouverture de la pénicilline G protégée en ester de PMB (**100**) a ensuite été entreprise avec le sel d'acétate de l'ester de TMSE (**128**) dans les conditions présentées au Schéma 57. Trois essais ont été réalisés et les bruts réactionnels ont été analysés par LC-MS. Deux pics à des temps de rétentions proches, présentent la même empreinte UV et le même spectre de masse. Ces derniers confirment la présence de deux diastéréoisomères avec un ratio compris entre 89:11 et 71:29 (Schéma 57).

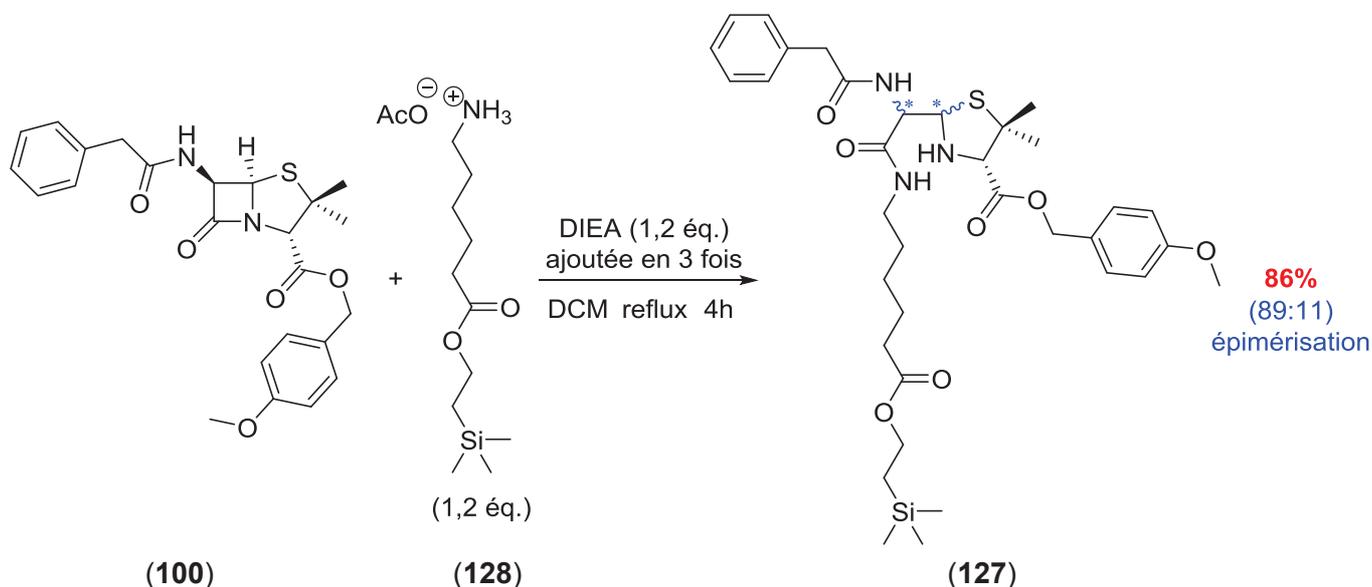


Schéma 57 : Synthèse du composé (**127**) : outil de la détermination du centre épimérisé

L'analyse du mélange de diastéréoisomères (**127**) par RMN ¹H et ¹³C ne présente pas de dédoublement des signaux, ce qui ne permet pas la détermination du centre épimérisé par RMN. Parmi les deux centres possiblement épimérisables : le C5 et le C6 du motif pénicilline, les suppositions de Meng nous laissent penser que le centre épimérisé serait le C6.¹⁰³

Il est intéressant de noter que le rendement obtenu lors de l'ouverture de la pénicilline protégée (**100**) par la lysine (**123**) est plus faible comparé à celui obtenu lors de l'ouverture avec l'ester de TMSE (**128**) qui ne possède pas la partie -NHFmoc. On peut donc conclure que la présence du groupement Fmoc induit des rendements d'ouverture plus faibles de par son clivage prématuré.

Pour finir, l'ouverture de la pénicilline protégée (**100**) par l'acétate d'ammonium (**128**) a également été mise en œuvre dans des conditions optimisées. Pour ce faire, la réaction est réalisée à température ambiante. De plus, très peu de base est introduite. La cinétique est plus lente, mais n'impacte pas le rendement. Le produit (**127**) est alors obtenu avec un rendement quantitatif. Cependant, il est obtenu énantiomériquement pur, prouvant que la température a une influence sur l'épimérisation (Schéma 58).

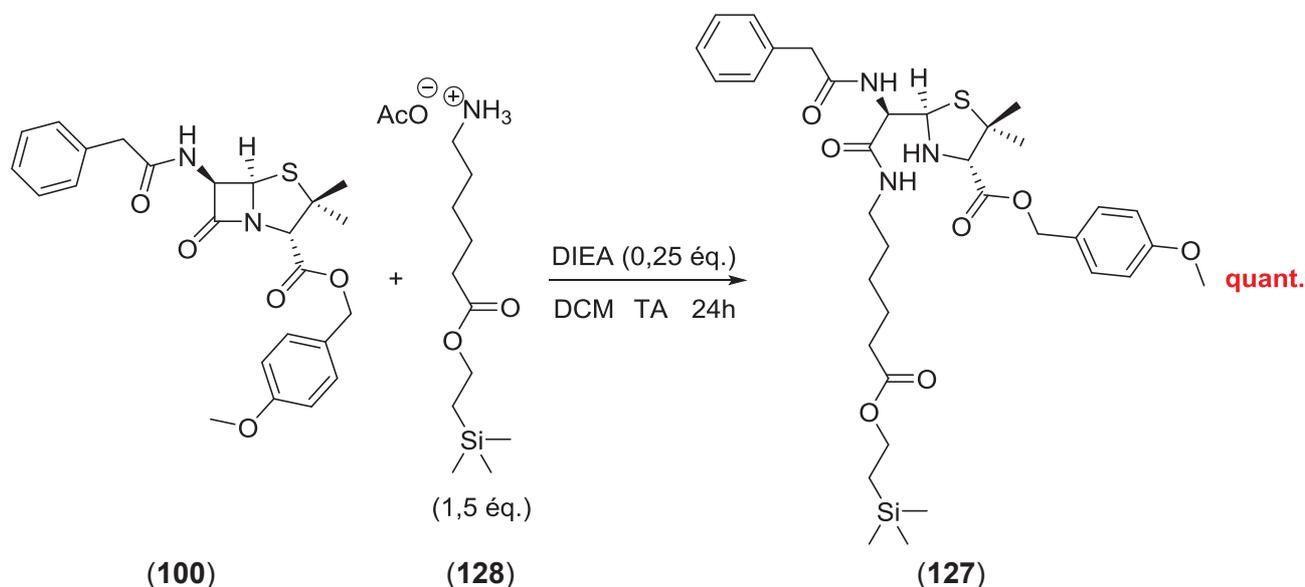


Schéma 58 : Optimisation de la réaction d'ouverture de la pénicilline G protégée en ester de PMB (100**) par le sel d'acétate du 6-aminohexanoate de 2-(triméthylsilyl)éthyle (**128**)**

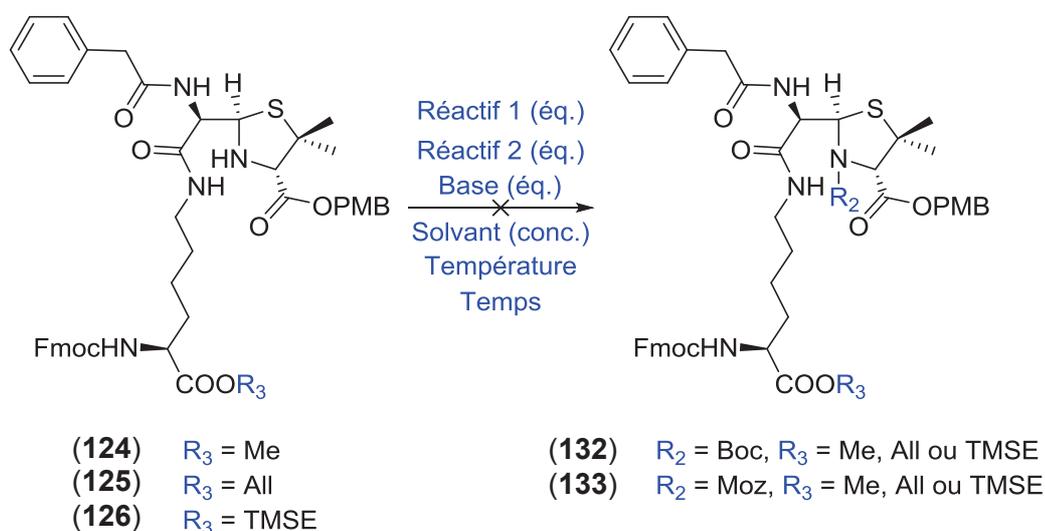
En conclusion, le produit (**126**) a été observé une fois en mélange diastéréomérique, le centre épimérisé restant à élucider. La séparation des épimères et l'analyse de ces derniers n'ayant pas permis d'identifier le centre épimérisé un analogue du produit (**126**) dépourvu du centre stéréogène de la lysine a été synthétisé. Trois essais de synthèse ont mené au produit (**127**) avec en moyenne un ratio diastéréomérique de 83:17. Le centre épimérisé est supposé être en position 6 du motif pénicilline. La température de réaction pourrait être la cause de l'épimérisation. Cependant, cette épimérisation n'ayant été observée qu'au départ de sels d'acétates d'ammonium, le contre ion acétate peut également jouer un rôle dans cette épimérisation. Malgré les meilleurs rendements d'ouverture observés avec ces dérivés, les sels de chlorure seront préférés étant donné qu'aucune épimérisation n'a été observée lors des ouvertures du cycle β -lactame avec les lysines (**101**), (**102**) et (**122**).

d) Protection de l'amine endocyclique

L'ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline protégée (**100**) par les différentes lysines protégées, a libéré l'amine secondaire en position 3 sur le cycle thiazolidine de la pénicilline. Cette amine doit donc être protégée pour pouvoir accéder au monomère (**92**) souhaité. Comme vu

précédemment dans la section « Choix des groupements protecteurs » (cf. Chapitre I partie III 1) a) p.114), le groupement protecteur de l'amine R₂ doit être sensible aux conditions acides et résister aux conditions basiques employées lors de la synthèse peptidique ainsi que celles mises en œuvre pour déprotéger la fonction acide de la lysine.

Un des groupements protecteurs répondant à ces critères est le carbamate de *tert*-butyle (Boc). L'amine endocyclique des produits (**124**), (**125**) ou (**126**) est mise en solution dans du THF à chaud avec du dicarbonate de di-*tert*-butyle, malheureusement le produit protégé (**132**) n'a pas été obtenu (Entrée 1, Tableau 18). L'encombrement autour de l'amine secondaire est donc mis en cause. Pour éviter ce problème – déjà rencontré lors de la protection de la fonction acide de la pénicilline G (**7**) – l'introduction d'un groupement moins encombré est expérimentée : le carbamate de *para*-méthoxybenzyle (Moz). L'amine endocyclique des produits (**124**), (**125**) ou (**126**) est : 1) soit mise en présence d'une base et de chloroformiate de *para*-méthoxybenzyle, généré *in situ* à partir de l'alcool, en suivant le mode opératoire de Blaser et ses collaborateurs (Entrée 2, Tableau 18),²⁵³ 2) soit mise en présence d'une base et de 4-méthoxybenzyl-4-nitrophénylcarbonate (Moz-OPhNO₂) ou de Moz-N₃, plus réactif (Entrées 3 et 4, Tableau 18).^{225,254} Cependant, ces méthodes n'ont pas permis d'accéder au produit convoité (**133**).



Entrée	Réactif 1 (éq.)	Réactif 2 (éq.)	Base (éq.)	Solvant	Conc.	T°C	Temps
1	(Boc) ₂ O (3 éq.)	-	DIEA (3 éq.)	THF	0,20 M	40°C	24h
2	Moz-OH (1,3 éq.)	triphosgène (0,6 éq.)	DIEA (1,3 éq. puis 2,5 éq.)	DCM	0,10 M	0°C à TA	4h puis 4h
3	Moz-OPhNO ₂ (1,7 éq. puis 2 éq.)	-	pyridine (1,9 éq.)	DCM	0,07 M	reflux	24h
4	Moz-N ₃ (2,4 éq.)	-	DMAP (1,6 éq.)	DCM	0,03 M	reflux	24h

Tableau 18 : Tentatives de protection de l'amine endocyclique des produits d'ouverture avec les groupements protecteurs acido-labiles Boc et Moz

Ces deux protections Boc et Moz sont probablement trop volumineuses pour accéder à l'amine secondaire de la thiazolidine. Un autre groupement protecteur a donc été testé : le carbamate de benzyle. Ce dernier est par contre beaucoup moins sensible aux conditions acides mais peut tout de même être clivé dans des conditions forcées.²⁵⁵

Le carbamate de benzyle est introduit avec succès sur les trois produits **(124)**, **(125)** et **(126)**. Pour ce faire : un large excès de chloroformiate de benzyle est introduit ainsi qu'un excès de base. De plus, le chloroformiate de benzyle est introduit par portion pour éviter sa dégradation dans le milieu réactionnel. La réaction est réalisée à chaud pour pouvoir activer l'amine et écourter le temps de la réaction. Les rendements en produits protégés **(134)**, **(135)** et **(136)** sont médiocres. L'encombrement et la difficulté pour le réactif d'atteindre l'amine sont encore une fois mis en cause. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour l'ester de méthyle **(134)** lorsque 10 équivalents de chloroformiate de benzyle sont utilisés. Quant aux esters d'allyle et de TMSE, 12,5 et 14 équivalents de chloroformiate de benzyle sont nécessaires pour obtenir les thiazolidines protégées avec des rendements de 62% (Schéma 59).

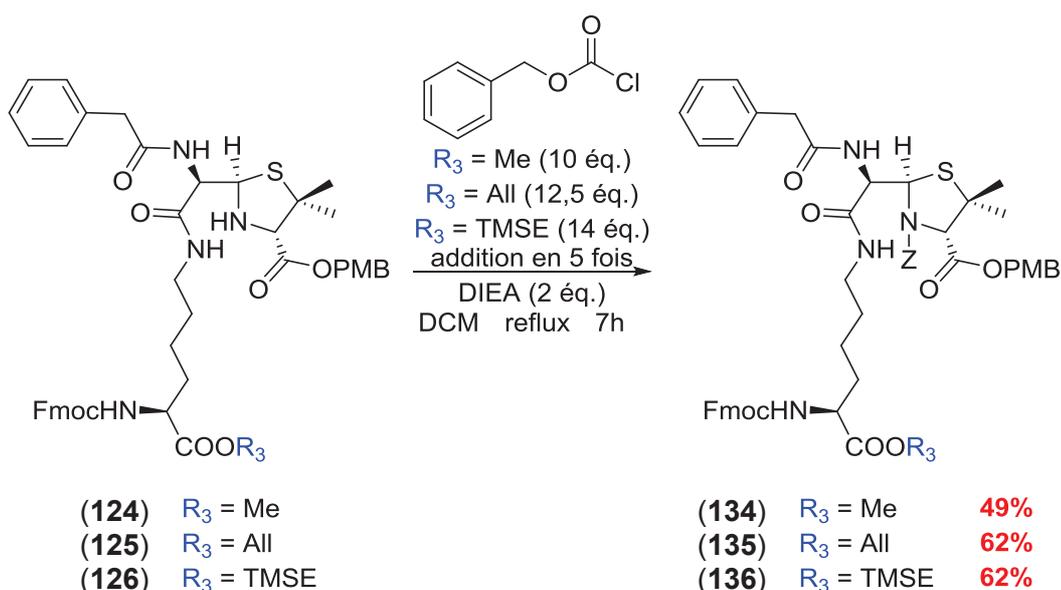


Schéma 59 : Protection de l'amine endocyclique des composés (124), (125) et (126) par le carbamate de benzyle

En conclusion l'amine endocyclique est difficilement protégeable du fait de son encombrement. Cependant le groupement carbamate de benzyle a pu être introduit avec des rendements corrects.

e) Déprotection de la fonction acide carboxylique de la lysine

Le clivage du groupement protecteur de la lysine ne peut pas être réalisé avec des acides de Bronsted ou de Lewis tels que AlCl_3 pour éviter la déprotection des groupements R_1 et R_2 de la pénicilline, ni en milieu basique pour éviter la déprotection de l'amine de la chaîne latérale de la lysine.

Les premiers essais de déprotection ont été réalisés sur l'ester de méthyle (**134**), selon une $\text{S}_{\text{N}}2$ désalkylante (cf. Schéma 48 p.120).²⁴⁰ L'ester de méthyle (**134**) est mis en solution dans de l'acétate d'éthyle avec un excès d'iodure de lithium. Même après 24h de réaction, le produit de départ (**134**) est retrouvé intact (Schéma 60).

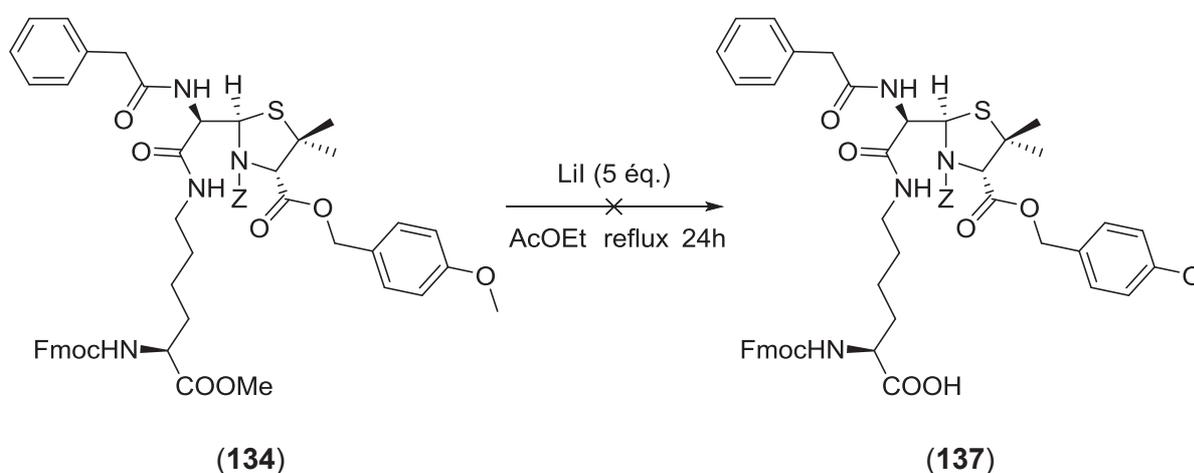


Schéma 60 : Tentative de clivage du groupement méthyle par une $\text{S}_{\text{N}}2$ désalkylante d'après le mode opératoire de Biron et Kessler.²⁴⁰

La déprotection de l'ester de TMSE a alors été tentée. Parmi les deux méthodes de clivage sélectionnées précédemment, celle utilisant l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a été expérimentée (cf. Chapitre I partie III 1) a) Schéma 50 p.121).^{243,244} L'ester de TMSE (**136**), traité par un excès de trifluorure de bore étherate n'a cependant pas mené à l'acide (**137**), le groupement PMB protégeant l'acide du motif pénicilline étant le premier à être clivé.

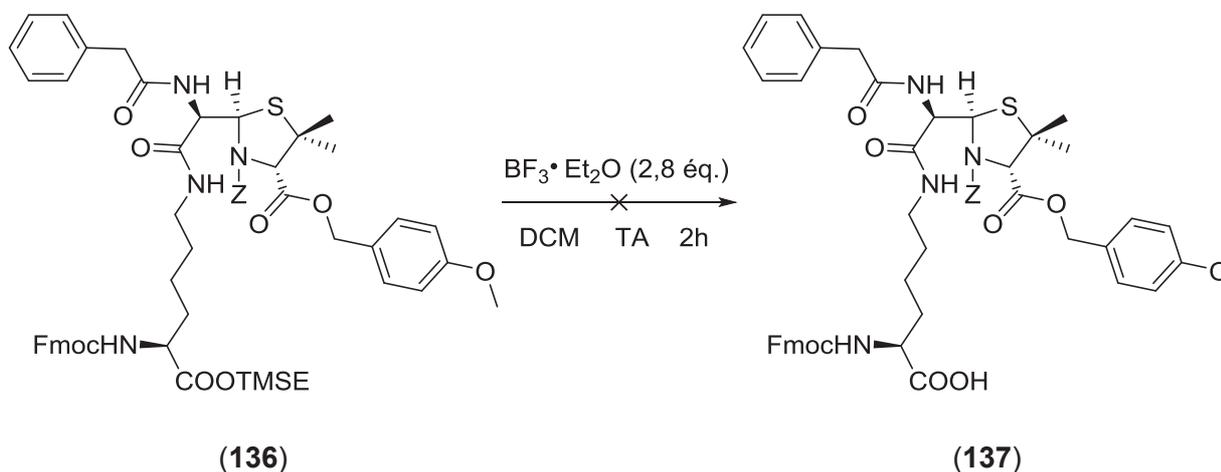


Schéma 61 : Tentative de clivage du groupement 2-(triméthylsilyl)éthyle en présence de trifluorure de bore étheraté

En dernier lieu des essais de déprotection du produit ester d'allyle (**135**) ont été réalisés. Le groupement allyle a l'avantage d'être facilement clivé en condition neutre avec un complexe de palladium (0) soluble dans les solvants organiques, par exemple le palladium tétrakis(triphénylphosphine). La réaction doit être réalisée en présence d'une molécule qui piègera le groupement allyle dégagé. Pour ce faire les dérivés de la morpholine sont usuellement utilisés.^{225,256} Cependant, le groupement Fmoc résiste peu à un traitement à la morpholine.²⁴² Une base faible (ou un de ses dérivés) peut alors être utilisée : l'acide barbiturique. Comme le démontre le brevet de Nishimura et Shimawaki, l'action du palladium tétrakis(triphénylphosphine) et du dérivé *N,N'*-diméthyle de l'acide barbiturique sur l'ester d'allyle de la cystéine protégée *N*-Fmoc et *S*-TMSE (**138**) permet d'obtenir avec un très bon rendement le produit (**139**) sous sa forme acide carboxylique.²⁵⁷ De plus, cet exemple montre que les thio-éthers dans ces conditions ne piègent pas le catalyseur au palladium (Schéma 62).

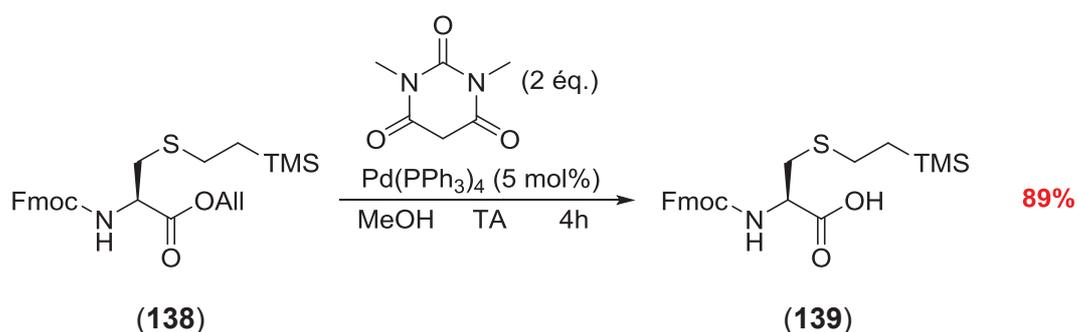


Schéma 62 : Déprotection sélective du groupement allyle sur la Fmoc-Cys(TMSE)-OAll (**138**) à l'aide de palladium tétrakis(triphénylphosphine) et du dérivé *N,N'*-diméthyle de l'acide barbiturique d'après un brevet de Nishimura et Shimawaki²⁵⁷

Cette réaction est transposable aux pénicillines qui possèdent également une fonction thio-éther dans leur cycle thiazolidine. La déprotection est donc effectuée selon le protocole de Nishimura et Shimawaki avec de l'acide barbiturique comme piègeur d'allyle. Ce dernier étant soluble dans l'éthanol, un mélange de solvant entre l'éthanol solubilisant l'acide barbiturique et du dichlorométhane dans lequel le produit (**135**) est mis en solution, a permis d'accéder au composé (**137**) avec de très bons rendements de 80%, et à l'échelle du gramme (Schéma 63).

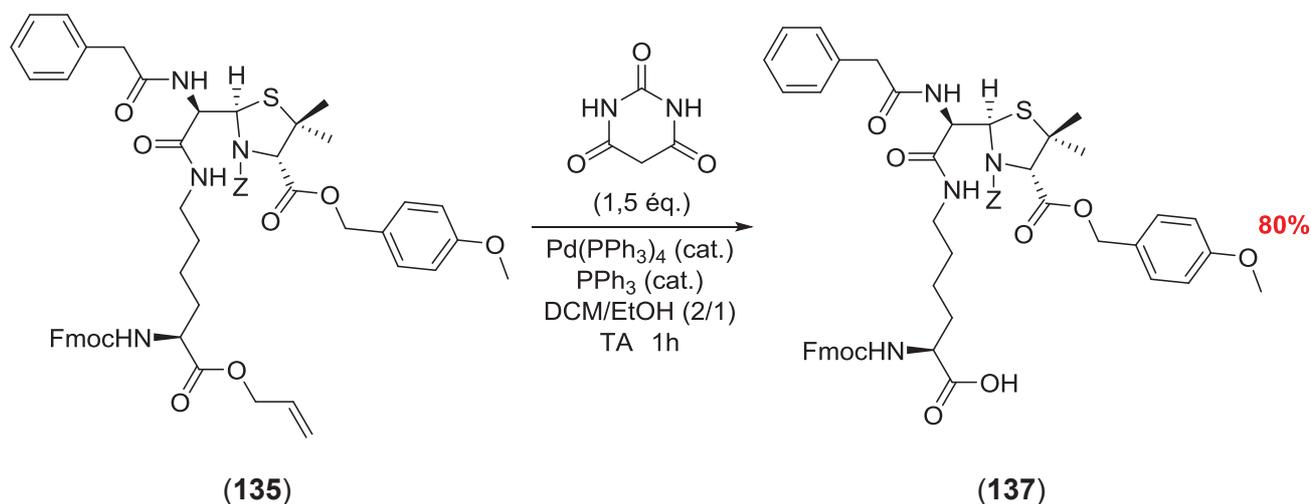


Schéma 63 : Clivage du groupement allyle du composé (135) avec du palladium tétrakis(triphénylphosphine) et de l'acide barbiturique.

Le mécanisme mis en jeu lors de cette déprotection est présenté dans le Schéma 64 ci-après. En premier lieu le complexe $\text{Pd(PPh}_3)_4$ perd un de ses ligands pour donner le $\text{Pd(PPh}_3)_3$ qui s'engage dans un cycle catalytique au cours duquel il s'associe au groupement allyle du composé (**135**) (représenté par la lettre R), en perdant un autre ligand. Une addition oxydante permet de former le complexe π -allyle et de passer le palladium à l'état d'oxydation (II). Un échange de ligand permet au groupement R de se détacher du complexe, puis l'acide barbiturique (B-H) intervient. Il induit un échange de contre-ion du complexe en donnant son proton au groupement R qui représente le produit convoité (**137**). Un autre échange de ligand permet au groupement B d'être complexé avec le palladium, une élimination réductrice abaisse le palladium à l'état d'oxydation (0) puis une dissociation permet de libérer l'acide barbiturique ayant piégé l'allyle ainsi que de recouvrir le $\text{Pd(PPh}_3)_3$ qui est alors réengagé dans le cycle catalytique (Schéma 64).

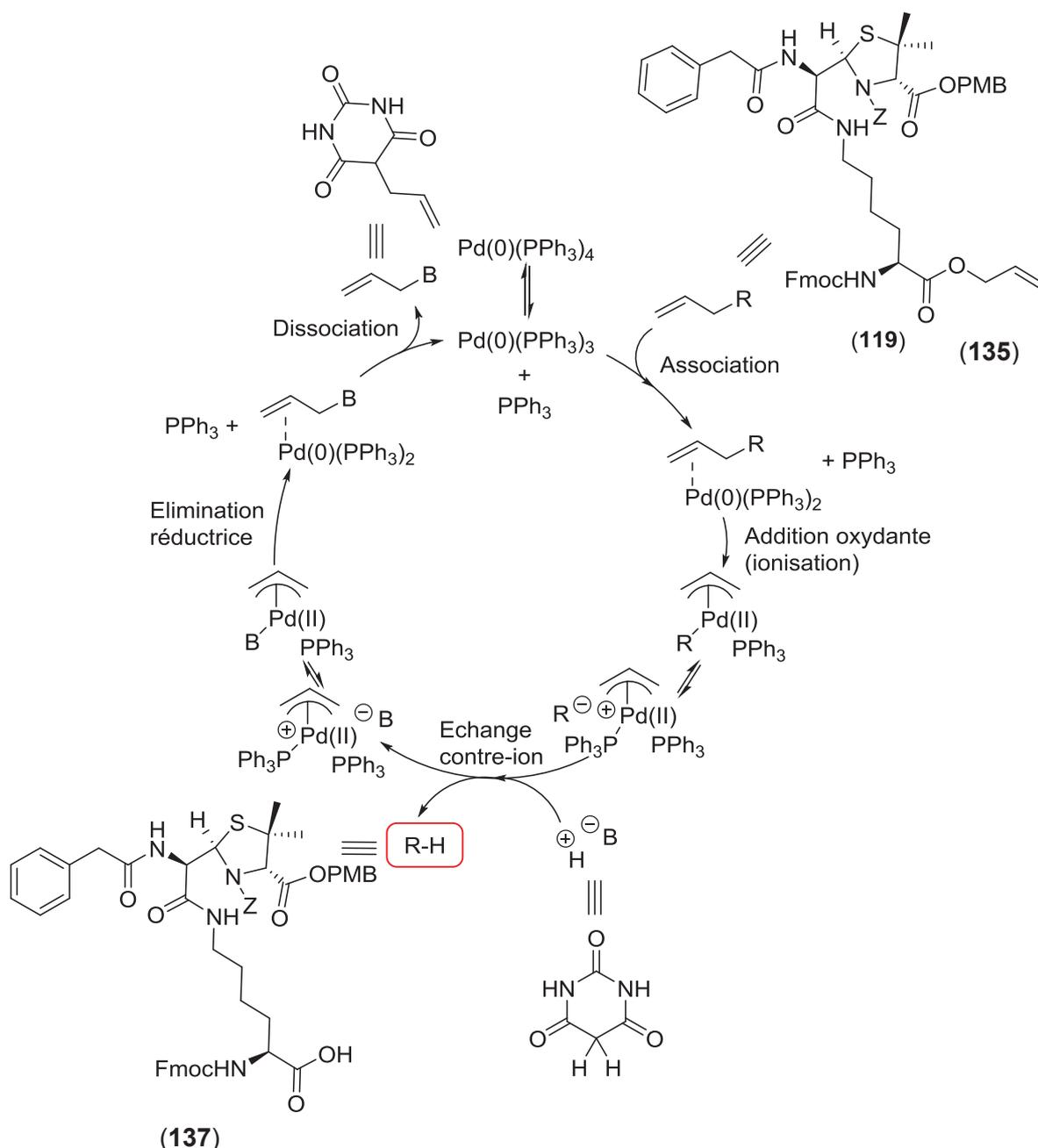


Schéma 64 : Mécanisme de clivage du groupement allyle par le palladium tétrakis(triphénylphosphine) et l'acide barbiturique²⁵⁶

Le monomère (137) en main, les peptides sélectionnés précédemment (*cf.* Chapitre I partie II 3) p.110) ont pu être synthétisés. Ces synthèses ont été réalisées par la société Proteogenix à Schiltigheim (67). Les couplages sont réalisés selon la stratégie Fmoc, en présence d'HOBt et de DCC à 30°C dans du DMF. Les peptides sont ensuite déprotégés de leurs groupements protecteurs *via* un traitement en présence de 95% de TFA. Après une purification par HPLC sur une colonne C18, les peptides atteignent des puretés de l'ordre de 80%. Cependant, comme suggéré lors de la protection de l'amine endocyclique, le carbamate de benzyle n'est pas très enclin à être clivé en milieu acide, à moins de conditions poussées. Les peptides une fois totalement déprotégés

présentent encore le carbamate de benzyle sur l'amine de la thiazolidine. L'analyse de masse des peptides purifiés montre un excès de 134 Da entre le peptide obtenu et celui attendu. Cet écart de masse correspond à la présence du groupement carbamate de benzyle.

Des essais de clivage de ce groupement par une hydrogénation catalytique au palladium ont alors été réalisés. Aucune des méthodes entreprises, même les plus douces, n'a permis de cliver ce carbamate sans décomposer tout le peptide.^{252,258,259} Encore une fois, l'encombrement stérique autour l'amine endocyclique pourrait expliquer l'accès difficile des réactifs permettant de la déprotéger. La faible réactivité de l'amine pourrait alors être tournée à notre avantage. Aussi, avons-nous choisi de ne pas protéger l'amine de la thiazolidine pour la suite de la synthèse.

La déprotection de l'acide carboxylique de la lysine est donc effectuée sur l'adduit Lys-PG (**125**) dépourvu de groupement protecteur sur l'azote du cycle thiazolidine. La réaction est réalisée dans les conditions de Nishimura et Shimawaki.²⁵⁷ Le produit déprotégé (**140**) est obtenu avec un très bon rendement de 86%, et à l'échelle du gramme (Schéma 65).

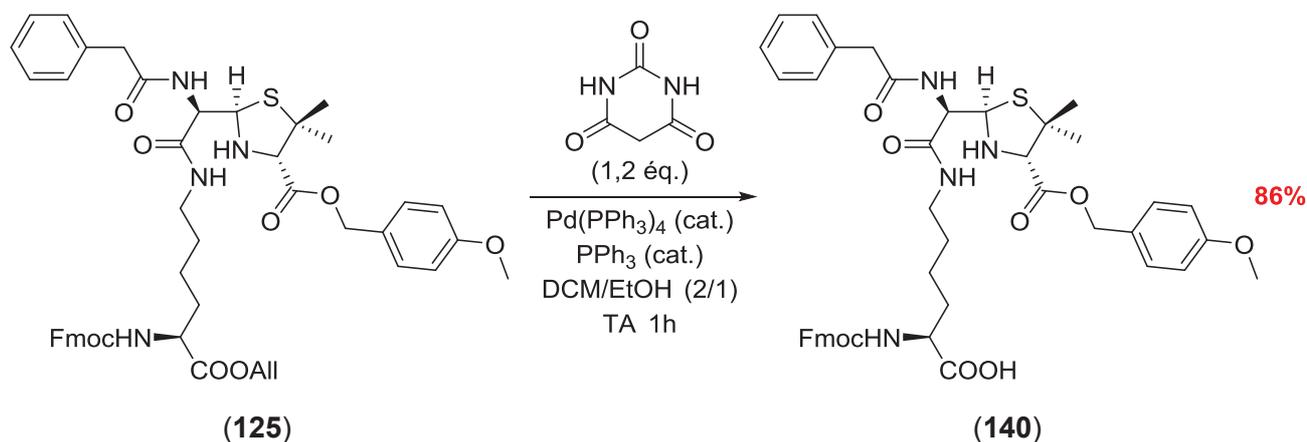


Schéma 65 : Clivage du groupement allyle sur le composé (**125**) dans les conditions de Nishimura et Shimawaki

Non seulement cette stratégie nous permet d'augmenter le rendement de déprotection de l'ester d'allyle, mais elle nous permet également d'améliorer le rendement global de la synthèse du monomère en supprimant deux étapes de protection et de déprotection. Le monomère (**140**) a donc été utilisé pour réaliser la synthèse des peptides sélectionnés pour l'étude sur la pénicilline G (**7**).

f) Conclusion sur la synthèse du monomère Lys-PG

Pour conclure, le monomère Lys-PG (**140**) a été synthétisé en 4 étapes avec un rendement global de 34%. A partir du sel de sodium de la pénicilline G (**7**), la protection de son acide carboxylique par un groupement *para*-méthoxybenzyle donne le composé (**100**) avec un très bon rendement. La lysine commerciale (**96**) *N*²-protégée par un groupement Fmoc a ensuite été protégée au niveau de sa fonction acide carboxylique en ester d'allyle, aboutissant au chlorhydrate (**102**), avec

un rendement quantitatif. L'ouverture du β -lactame de la pénicilline protégée (**100**) par la lysine protégée (**102**) conduit au produit ouvert (**125**) avec un rendement modeste. La dernière étape de la synthèse a consisté en la déprotection de la fonction acide de la lysine. Le clivage du groupement allyle, dans des conditions douces, mène au monomère souhaité (**140**) avec un excellent rendement. Les rendements ont pu être maintenus à l'échelle du gramme (Schéma 66).

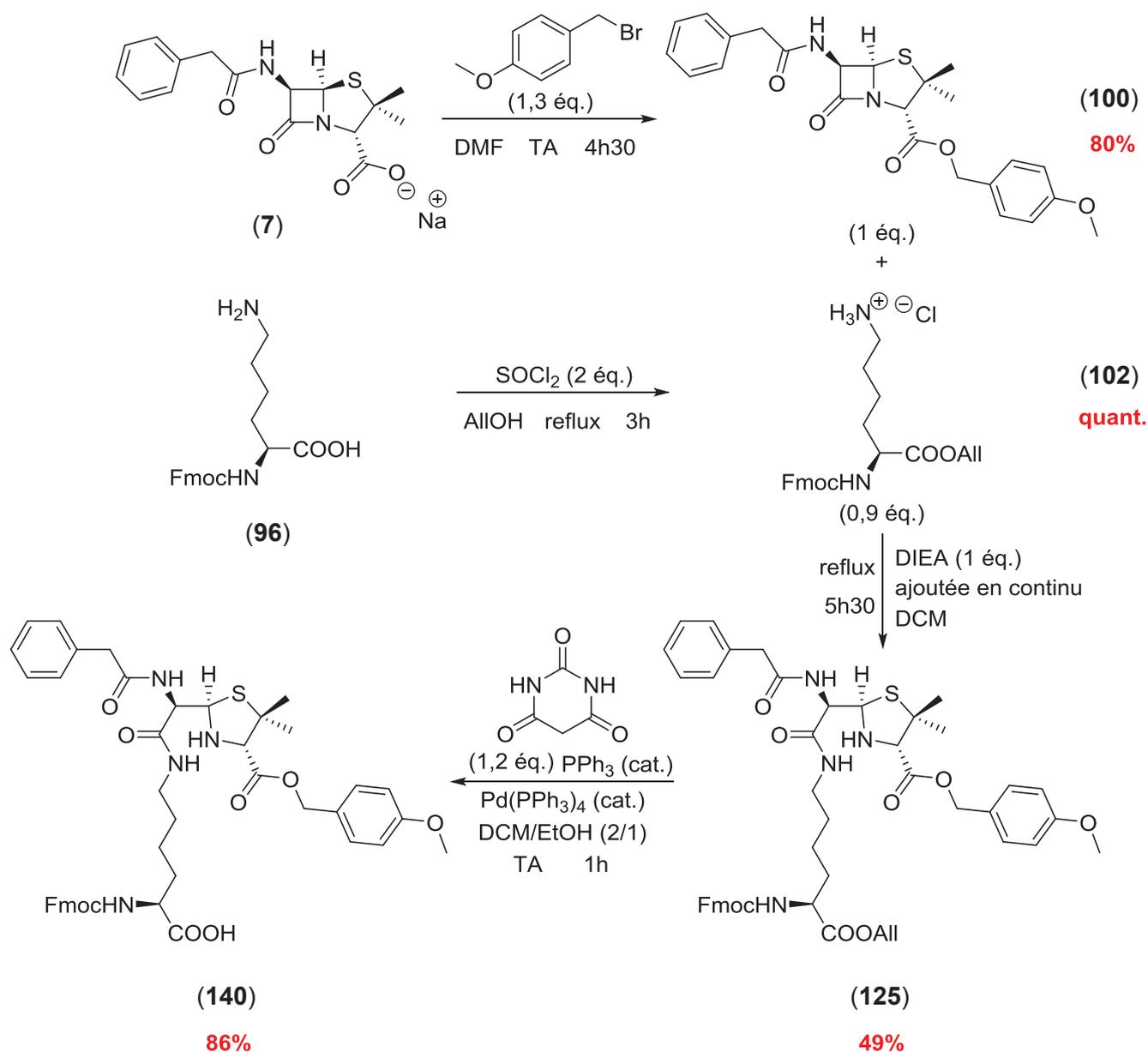


Schéma 66 : Récapitulatif de la synthèse du monomère Lys-PG (**140**)

La synthèse des 14 peptides sélectionnés a donc été effectuée avec succès avec ce monomère (**140**) par la société Proteogenix. La viabilité de la stratégie de synthèse mise en place permettant de passer par un monomère de type acide aminé modifié est donc confirmée. En suivant le modèle mis en place pour le monomère Lys-PG (**140**), la synthèse du monomère lysine-amoxicilline a été entreprise.

2) Synthèse du monomère Lys-AX

Le déterminant antigénique de l'amoxicilline (**4**) est – comme pour la pénicilline G (**7**) – obtenu par l'ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline par l'amine nucléophile de la chaîne latérale des lysines. En suivant la logique adoptée pour la synthèse du monomère Lys-PG, la rétrosynthèse présentée en Schéma 67 ci-après permet d'accéder au monomère Fmoc-Lys(amoxicilline protégée)-OH souhaité (**141**). Ce dernier est obtenu par une déprotection sélective de l'acide carboxylique de la partie lysine du produit de couplage entre l'amoxicilline protégée sur ses fonctions réactives par des groupements R_1 , R_2 et R_4 (**142**) et une N^2 -Fmoc lysine orthogonalement protégée sur sa fonction acide carboxylique par un groupement R_3 (**94**). Elle sera elle-même issue de la Fmoc-Lys-OH commerciale (**96**). Comme pour le monomère lysine-pénicilline G (**140**), une amine secondaire est formée lors de l'ouverture du cycle β -lactame. Fort de l'expérience acquise par l'étude sur la pénicilline G (**7**), la décision de ne pas protéger cette amine a été prise. L'amoxicilline (**142**) sera quant à elle protégée au niveau de sa fonction acide carboxylique par un groupement R_1 du même type que celui utilisé pour protéger la pénicilline G (**7**). La différence réside dans le fait qu'elle doit également être protégée sur ses fonctions amine primaire et phénol, qui peuvent être réactives, par des groupements protecteurs notés R_2 et R_4 . Cette amoxicilline protégée (**142**) sera issue de l'amoxicilline commerciale (**4**) (Schéma 67).

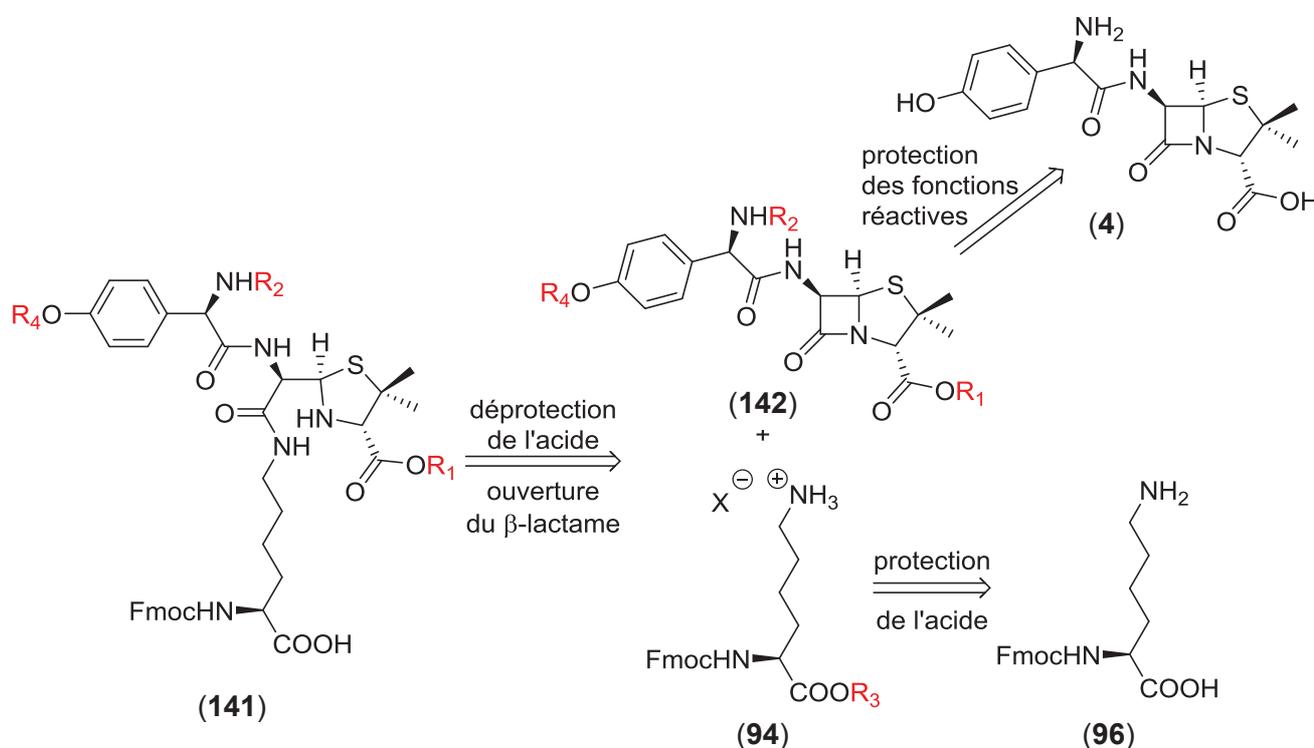


Schéma 67 : Rétrosynthèse du monomère Lys-AX protégé (**141**)

La première étape de la synthèse est donc axée sur le choix des groupements protecteurs R_1 , R_2 , R_3 ainsi que R_4 . Comme pour la synthèse du monomère Lys-PG (**140**), le choix doit permettre d'avoir des groupements protecteurs orthogonaux en vue de protections et déprotections sélectives.

a) Choix des groupements protecteurs

Après les bons résultats obtenus pour la synthèse du monomère Fmoc-Lys(PG-OPMB)-OH (**140**), l'utilisation du groupement allyle comme groupement protecteur de la fonction acide carboxylique de la lysine semble rester un bon compromis pour cette nouvelle problématique de synthèse. Cette lysine (**102**) a donc été synthétisée par la méthode présentée dans l'étude sur la pénicilline G (**7**) (cf. Chapitre I partie III 1) a) Schéma 43 p.117).

La stratégie Fmoc étant utilisée pour cette synthèse, comme pour l'étude sur la pénicilline G (**7**), les groupements protecteurs R_1 , R_2 et R_4 , présents sur l'amoxicilline (**142**) devront être acido-labiles pour pouvoir être clivés en fin de synthèse peptidique. Ils devront également être résistants aux bases puisque la synthèse peptidique requiert des traitements basiques lors de l'ajout de chaque acide aminé du peptide, ainsi qu'aux conditions de clivage métallo-catalysées de la fonction allyle (Schéma 68).

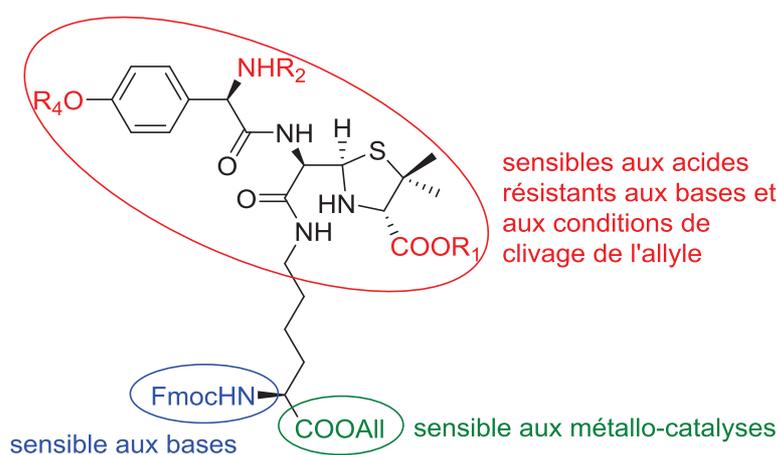


Schéma 68 : Choix des groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Lys(amoxicilline protégée)-OH (141**)**

Au vu des bons résultats obtenus lors de l'insertion du groupement *para*-méthoxybenzyle pour protéger la fonction acide carboxylique de la pénicilline G (**7**) (cf. Chapitre I partie III 1) a) Schéma 42 p.116), ce groupement va également être utilisé pour la protection de l'acide carboxylique de l'amoxicilline (**4**) (R_1). Ce groupement pouvant également être utilisé dans le but de protéger des alcools sous forme d'éthers, il va aussi être utilisé pour protéger le phénol de l'amoxicilline (**4**) ($R_4 = R_1$). Pour ce qui est du groupement R_2 protégeant l'amine primaire de l'amoxicilline (**4**), le carbamate de *tert*-butyle (Boc) a été sélectionné puisqu'il répond à tous les critères fixés précédemment. La synthèse de l'amoxicilline protégée (**142**) se déroulera en deux temps, dans un premier temps l'amine sera protégée par le groupement Boc, conduisant à l'intermédiaire (**143**), puis les fonctions acide carboxylique et phénol seront protégées en même temps par le groupement *para*-méthoxybenzyle.

Dans le but de protéger l'amine primaire de l'amoxicilline commerciale (**4**) par un carbamate de *tert*-butyle, des méthodes classiques ont été testées dans un premier temps. La faible solubilité de l'amoxicilline (**4**) dans les solvants organiques est due au fait qu'elle soit sous forme zwitterionique à l'état naturel. En conséquence elle est parfaitement soluble dans l'eau. Les premiers tests de protection de l'amine sont donc réalisés dans un mélange de solvant 1,4-dioxane/eau ou tétrahydrofurane (THF)/eau. Les premiers essais s'inspirent des travaux de la littérature menés au départ de la glycine (**144**),²⁶⁰ ou de l'acide *ortho*-aminobenzoïque (**145**).²⁶¹ Les conditions de protection utilisent le dicarbonate de di-*tert*-butyle introduit en léger excès, en présence de soude comme base (Schéma 69).

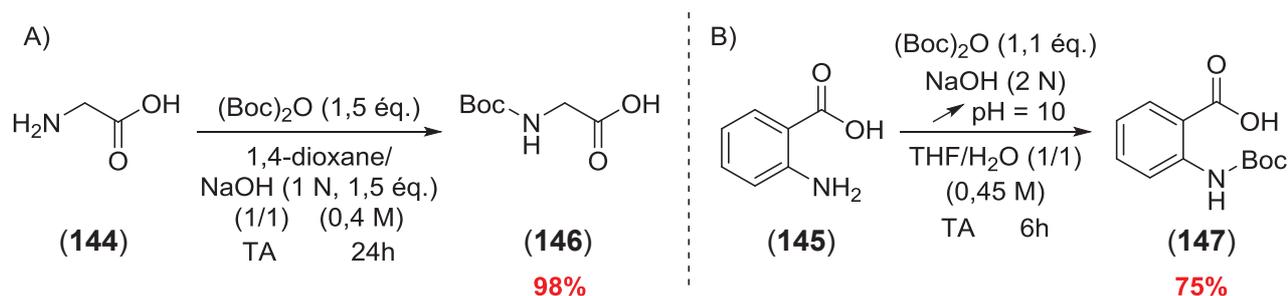
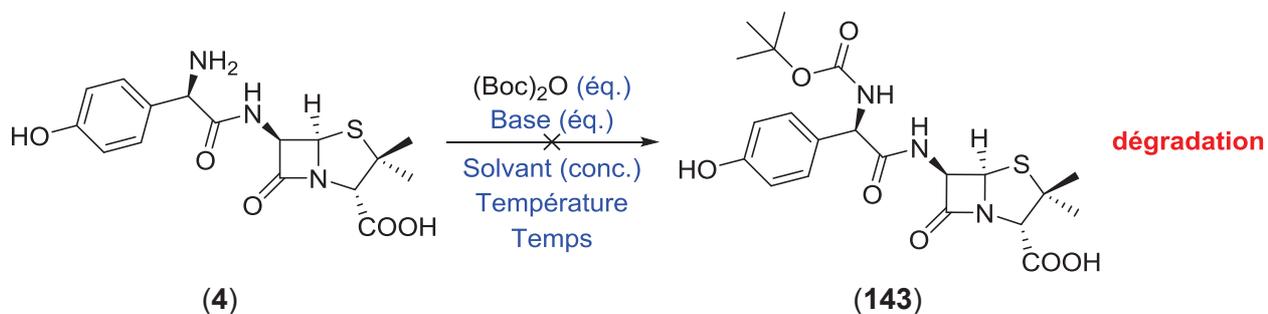


Schéma 69 : Protections des amines primaires en carbamate de *tert*-butyle d'après Zang *et al.* sur la glycine (**144**) (A),²⁶⁰ et d'après Verma *et al.* sur l'acide *ortho*-aminobenzoïque (**145**) (B)²⁶¹

Cependant, dans ces conditions, l'amoxicilline protégée (**143**) n'est pas obtenue (Entrées 1 et 2, Tableau 19), l'amoxicilline (**4**) s'étant rapidement dégradée. Les conditions aqueuses et fortement basiques ne sont pas adaptées à notre substrat : ce dernier pouvant s'ouvrir par l'addition du nucléophile OH⁻. Ponnusamy et ses collaborateurs ont montré que les acides aminés (glycine (**144**), phénylalanine (**148**), tyrosine (**149**) et proline (**150**)) pouvaient également être protégés par un groupement Boc en milieu organique (DMF) en présence d'une base également organique, faiblement nucléophile : la triéthylamine (Schéma 70).²⁶² L'application de ces conditions à l'amoxicilline (**4**) s'est avérée infructueuse, même en augmentant les quantités de réactif (Entrées 3, 4 et 5, Tableau 19). Le traitement est alors remis en cause : pour obtenir les acides aminés sous forme *N*-Boc protégés et acide libre (**146**), (**155**), (**156**) et (**157**), Ponnusamy *et al.* acidifient le milieu en fin de réaction.²⁶² Cependant, dans notre cas, l'amoxicilline (**143**) reste en phase aqueuse et se dégrade pendant le traitement aqueux. Même lors de la lyophilisation de la phase aqueuse, le produit *N*-protégé (**143**) n'est pas récupéré.



Entrée	Eq. (Boc) ₂ O	Base (éq.)	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Référence
1	1,5 éq.	NaOH (3 éq.)	1,4-dioxane/H ₂ O	0,40 M	TA	5h30	Zang <i>et al.</i> ²⁶⁰
2	1,1 éq.	NaOH (2 éq.)	THF/H ₂ O	0,45 M	TA	4h	Verma <i>et al.</i> ²⁶¹
3	1,2 éq.	Et ₃ N (3,5 éq.)	DMF	0,25 M	50°C à TA	0,75h	Ponnusamy <i>et al.</i> ²⁶²
4	3 éq.	Et ₃ N (3,5 éq.)	DMF	0,25 M	50°C à TA	0,75h	Ponnusamy <i>et al.</i> ²⁶²
5	4 éq.	Et ₃ N (3,5 éq.)	DMF	0,25 M	50°C à TA	0,75h	Ponnusamy <i>et al.</i> ²⁶²

Tableau 19 : Différents essais de synthèse de l'amoxicilline protégée par un carbamate de *tert*-butyle sur sa fonction amine primaire (143) à partir de l'amoxicilline commerciale (4)

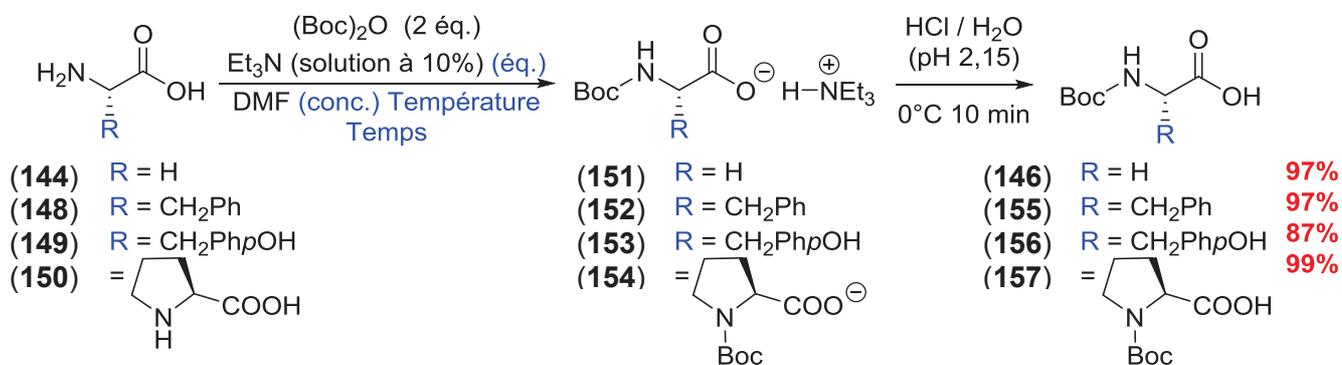
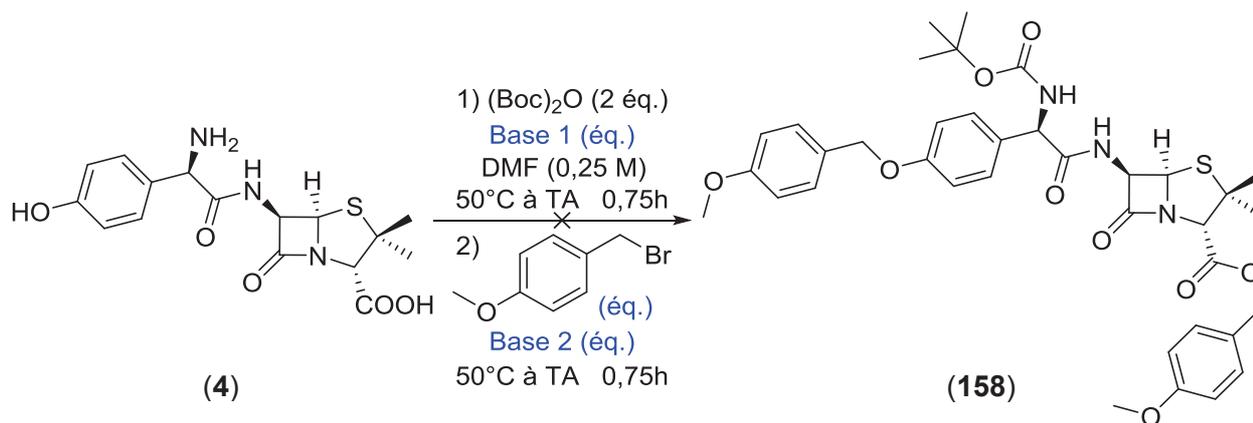


Schéma 70 : Protection des acides aminés (144), (148), (149) et (150) en *N*-Boc (146), (155), (156) et (157) d'après Ponnusamy et ses collaborateurs²⁶²

Entrée	Acide aminé	Départ	Eq. Et ₃ N	Conc.	T°C	Temps	Rdt
1	Gly	(144)	1,1 éq.	0,67 M	60°C à TA	30 + 30min	97%
2	Phe	(148)	4,4 éq.	0,17 M	40-50°C à TA	10 + 30min	97%
3	Tyr	(149)	4,4 éq.	0,17 M	40-50°C à TA	10 + 30min	87%
4	Pro	(150)	1,1 éq.	0,67 M	40-50°C à TA	5 + 30min	99%

Tableau 20 : Différentes conditions utilisées par Ponnusamy *et al.* en fonction de l'acide aminé étudié²⁶²

Etant donné la difficulté d'obtenir le produit désiré (**143**), la protection de toutes les fonctions réactives de l'amoxicilline commerciale (**4**) est tentée en monotope (Tableau 21). Le produit entièrement protégé (**158**) étant trop lipophile pour être soluble dans l'eau, il sera récupéré dans la phase organique. La protection en monotope a d'abord été effectuée sur la base du mode opératoire de Ponnusamy et ses collaborateurs mais en ajoutant du bromure de *para*-méthoxybenzyle après 45 minutes de réaction. Cependant le produit désiré (**158**) n'a pas pu être isolé (Entrée 1, Tableau 21).²⁶² De plus, une analyse RMN ¹H du produit brut après extraction met en exergue le fait qu'une des deux fonctions (acide ou phénol) n'est pas protégée par le groupement PMB. Au vu des réactivités théoriques, le phénol est plus probablement la fonction non protégée. La réaction est alors lancée avec une autre base, plus forte, l'hydrogénocarbonate de sodium, mais le même spectre RMN ¹H du mélange réactionnel après extraction est obtenu (Entrée 2, Tableau 21). La réaction est tentée en ajoutant de la base en deux temps : la triéthylamine pour la première étape de *tert*-butoxycarbonylation, puis du carbonate de sodium pour l'étherification et l'estérification ; ou encore, de la DBU à la place de la triéthylamine (son pKa étant plus élevé) (Entrées 3 et 4, Tableau 21). Comme pour les deux autres réactions, le phénol de l'amoxicilline (**4**) n'a jamais été protégé.



Entrée	Eq. PMB-Br	Base 1 (éq.)	Base 2 (éq.)	Résultat
1	2,2 éq.	Et ₃ N (3,5 éq.)	-	phénol non protégé
2	2,2 éq.	NaHCO ₃ (3,5 éq.)	-	phénol non protégé
3	2,5 éq.	Et ₃ N (3,5 éq.)	Na ₂ CO ₃ (3 éq.)	phénol non protégé
4	2,5 éq.	DBU (3 éq.)	Na ₂ CO ₃ (3 éq.)	phénol non protégé

Tableau 21 : Tentatives de protection des trois fonctions réactives de l'amoxicilline commerciale (**4**) en carbamate de *tert*-butyle, ester et éther de *para*-méthoxybenzyle (**158**) en monotope

Le manque de réactivité constaté de la fonction phénol de l'amoxicilline (**4**) a également été observé dans la littérature, par Hakimelahi et ses collaborateurs.²⁶³ Dans cette publication, l'amoxicilline (**4**) est protégée par un groupement diphénylméthyle (Dpm), avec un rendement modeste, sur ses fonctions amine primaire et acide carboxylique en présence de triéthylamine comme base (Schéma 71).

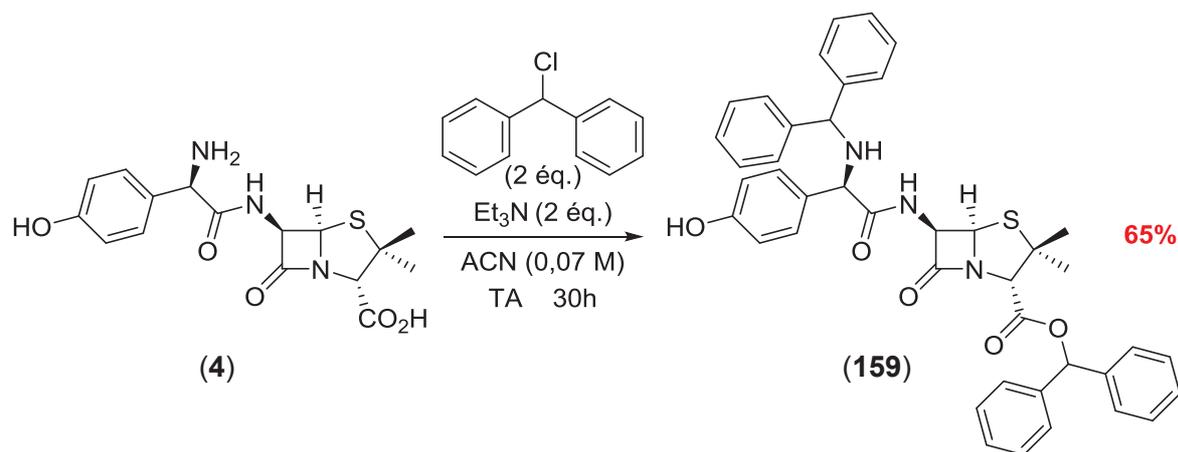
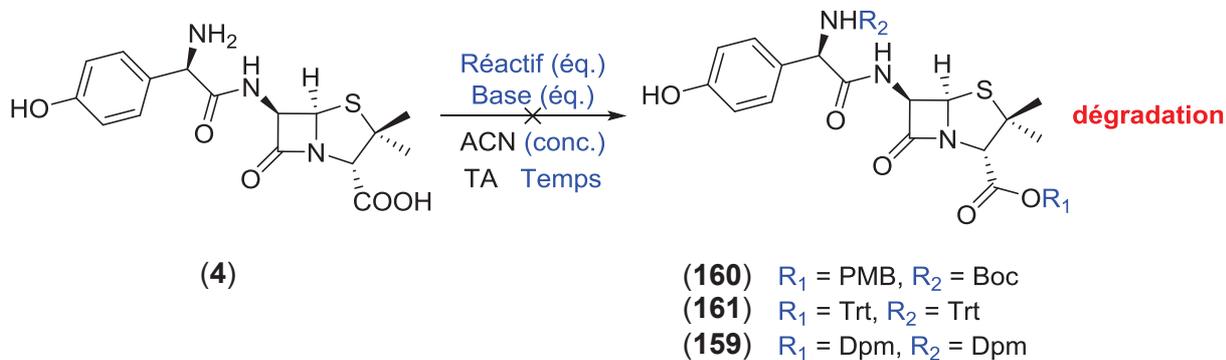


Schéma 71 : Protection de l'amoxicilline (**4**) par le groupement diphénylméthyle d'après Hakimelahi *et al.*²⁶³

La différence avec le mode opératoire de Ponnusamy *et al.* est le solvant. L'acétonitrile a l'avantage de présenter un point d'ébullition plus bas que le DMF, permettant une élimination plus facile par évaporation sous pression réduite. Le mode opératoire d'Hakimelahi a donc été reproduit (Tableau 22). Un mélange de (Boc)₂O et de *para*-méthoxybenzyle est utilisé en substitution du chlorodiphénylméthane, mais aucun produit n'est obtenu (Entrée 1, Tableau 22). Pour mimer au plus près les conditions de Hakimelahi, des groupements protecteurs trityles ont tenté d'être introduits. Les trityles ont l'avantage d'être acido-labiles contrairement au groupement diphénylméthyle (Entrée 2, Tableau 22).²²⁵ Après un temps de réaction prolongé, seul un produit mono-tritylé est détecté d'après une analyse LC-MS du brut réactionnel. La réaction est donc réalisée une seconde fois dans un milieu plus concentré, avec plus d'équivalents de chlorure de trityle ainsi qu'une base plus forte : le carbonate de potassium (Entrée 3, Tableau 22). Cependant, aucun produit n'a été isolé. Nous avons alors reproduit la réaction de Hakimelahi dans les conditions décrites, cependant le produit (**159**) attendu n'a pas été isolé bien qu'observé par une analyse de LC-MS (Entrée 4, Tableau 22).



Entrée	Réactif (1 éq.)	Base (1 éq.)	Conc.	Temps	R ₁	R ₂
1	(Boc) ₂ O (1,1 éq.) + PMB-Br (1,1 éq.)	Et ₃ N (2,2 éq.)	0,07 M	7h	PMB	Boc
2	Trt-Cl (2 éq.)	Et ₃ N (2 éq.)	0,07 M	15h	Trt	Trt
3	Trt-Cl (4 éq.)	K ₂ CO ₃ (4 éq.)	0,12 M	15h	Trt	Trt
4	Dpm-Br (2 éq.)	Et ₃ N (2 éq.)	0,07 M	3h	Dpm	Dpm

Tableau 22 : Essais de protection de l'amine primaire et de l'acide carboxylique de l'amoxicilline commerciale (4) selon le mode opératoire de Hakimelahi *et al.*²⁶³

La dégradation du produit désiré lors de l'étape de purification étant mise en cause, nous avons envisagé de développer une stratégie de protection évitant des purifications par colonne chromatographique ou des extractions par des phases aqueuses. Aussi, l'amoxicilline (4) est mise en solution dans l'acétonitrile avec du dicarbonate de di-*tert*-butyle en très faible excès et laissée à température ambiante jusqu'à disparition de l'amoxicilline (4) de départ. L'amoxicilline (4) est entièrement consommée au bout de 15 heures et le produit protégé (143) est obtenu, à l'échelle du gramme, avec un rendement quantitatif (Schéma 72). Lors de la réaction de l'alcool *tert*-butylique est formé, ce produit a une température d'ébullition de 82°C, pour faciliter son élimination des co-évaporations sont réalisées à l'aide de cyclohexane qui forme un azéotrope avec l'alcool (en proportion 60/40).

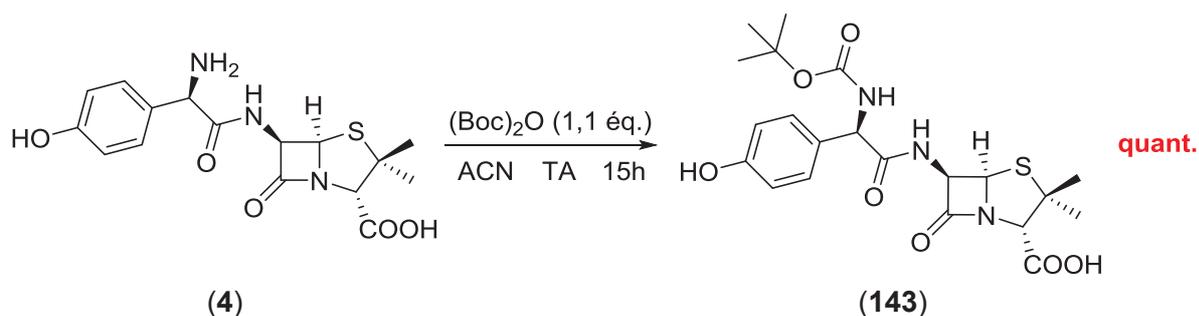


Schéma 72 : Synthèse de l'amoxicilline N-Boc (143) à partir de l'amoxicilline (4)

L'amoxicilline (**4**) ayant été *N*-protégée en carbamate de *tert*-butyle (**143**) avec succès, la protection de la fonction acide par le groupement *para*-méthoxybenzyle est entreprise. L'acétonitrile est conservée comme solvant de la réaction. Les conditions précédemment utilisées pour la pénicilline G (**7**), en présence de la triéthylamine et de bromure de *para*-méthoxybenzyle ne permettent pas d'isoler l'amoxicilline di-protégée (**160**). Seuls des produits dégradés sont obtenus. De plus, une grande quantité de sel de triéthylamine est formée. Selon Favre et ses collaborateurs, la fonction acide carboxylique de l'acide 6-aminopénicillanique (**33**) peut être protégée par un groupement pivaloyloxyméthyle (Pom) dans du DMF en présence de triéthylamine et de chlorure de pivaloyloxyméthyle (Schéma 73).²⁶⁴

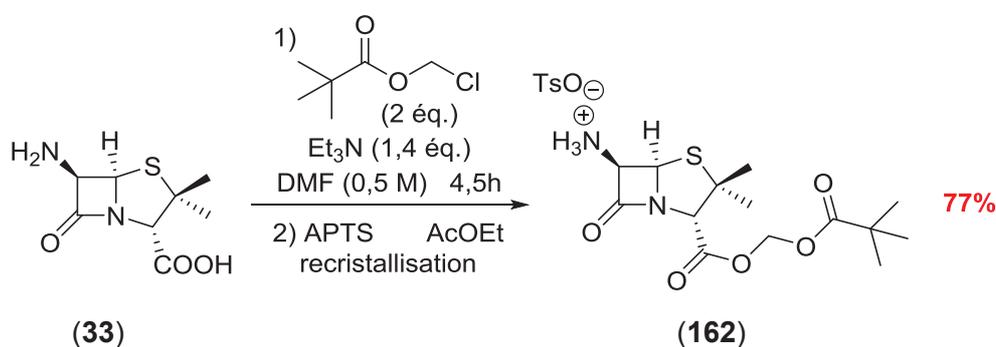
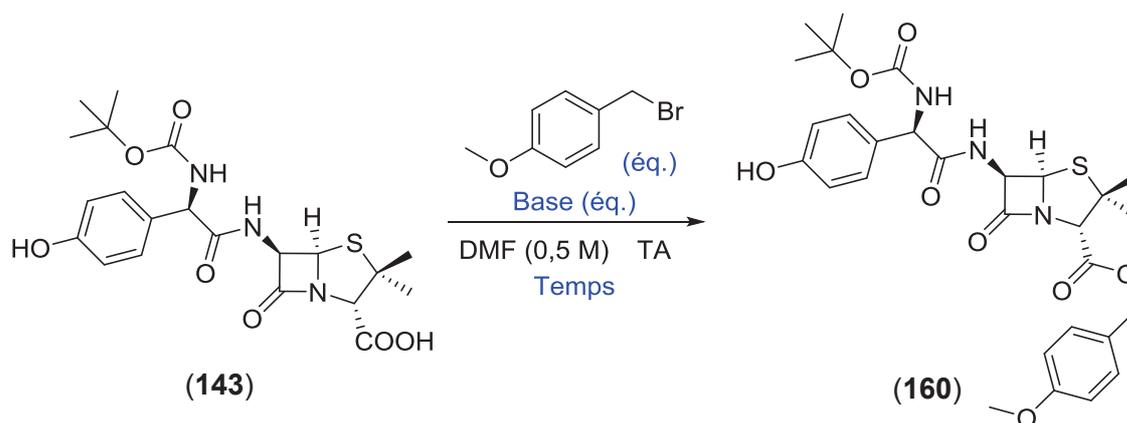


Schéma 73 : Protection de l'acide carboxylique du 6-APA (**33**) par un groupement pivaloyloxyméthyle d'après Favre et al.²⁶⁴

L'avantage de cette méthode est que le sel de chlorure de triéthylammonium précipite après l'addition d'une grande quantité d'acétate d'éthyle dans le mélange réactionnel. Des extractions sont ensuite réalisées pour éliminer du produit de départ n'ayant pas réagi ainsi que le DMF. La protection de l'amoxicilline *N*-Boc (**143**) en ester de *para*-méthoxybenzyle (**160**) est alors réalisée selon ces conditions (Tableau 23). La précipitation du sel de bromure de triéthylamine est bien observée, facilitant la purification. Après des extractions et lavages, le produit (**160**) est isolé avec du bromure de *para*-méthoxybenzyle, introduit en excès (Entrée 1, Tableau 23). Les essais de purification sur colonne de silice menant toujours à une dégradation du produit, un très faible excès de bromure de *para*-méthoxybenzyle est utilisé. De plus, le temps de la réaction est également prolongé afin d'augmenter le rendement en produit estérifié (Entrée 2, Tableau 23). Cependant quand la réaction est réalisée à plus grande échelle, les rendements chutent, en grande partie à cause des sels de triéthylammonium formant une émulsion lors de l'extraction (Entrées 3 et 4, Tableau 23). Pour permettre la consommation totale du réactif PMB-Br, ce dernier est finalement introduit dans la réaction en léger défaut. L'amoxicilline (**143**) sous forme d'acide libre étant soluble dans l'eau, seul le produit désiré (**160**) est isolé dans la phase organique suite aux lavages. Cette méthode permet d'obtenir le produit (**160**) avec une bonne pureté, observée en RMN et en LC-MS, sans avoir à effectuer de purifications supplémentaires par chromatographie sur colonne (Entrées 5 et 6, Tableau

23). Pour éviter une trop grande émulsion lors des lavages, le milieu réactionnel est concentré de moitié par une évaporation du DMF. Cependant cette manipulation cause une légère dégradation du produit, menant à un rendement inférieur (Entrée 7, Tableau 23). En changeant la triéthylamine par la diisopropyléthylamine, l'émulsion lors des lavages est supprimée et permet d'améliorer les rendements. La protection de l'amoxicilline *N*-Boc (**143**) est donc réalisée à l'échelle du gramme (Entrées 8, 9 et 10, Tableau 23). Par contre, l'utilisation de la DIEA en quantité stœchiométrique engendre une chute du rendement (Entrées 9 et 10, Tableau 23).



Entrée	Quantité (143)	Base (éq.)	Eq PMB-Br	Temps	Rdt
1	50 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	2 éq.	4,5h	52%
2	64 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	1,2 éq.	28h	61%
3	500 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	1,2 éq.	24h	51%
4	500 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	1,2 éq.	72h	44%
5	500 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	0,9 éq.	17h	38%
6	500 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	0,9 éq.	24h	35%
7	500 mg	Et ₃ N (1,4 éq.)	0,9 éq.	22h	28% ^a
8	1,5 g	DIEA (1,4 éq.)	0,9 éq.	24h	77%
9	2,0 g	DIEA (1 éq.)	0,9 éq.	24h	65%
10	2,3 g	DIEA (1 éq.)	0,9 éq.	28h	67%

a : Concentration du milieu avant l'extraction conduisant à la dégradation du produit

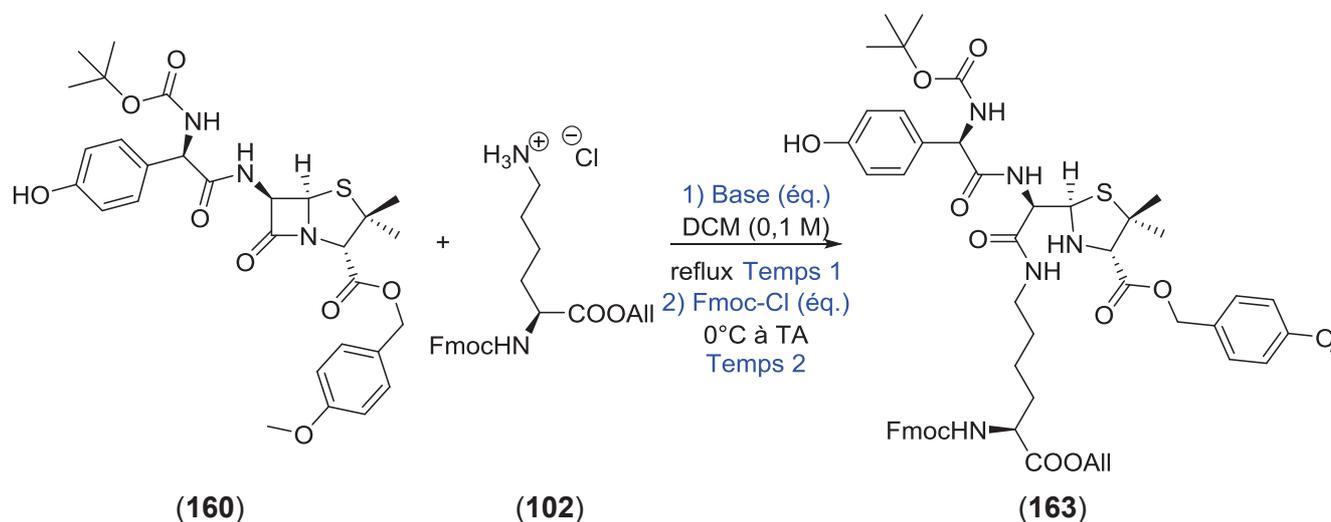
Tableau 23 : Optimisation de la protection de l'acide carboxylique de l'amoxicilline *N*-Boc (143**) en ester de *para*-méthoxybenzyle (**160**)**

En conclusion, la protection des fonctions réactives de l'amoxicilline (**4**) a été plus difficile que pour la pénicilline G (**7**). La fonction phénol de l'amoxicilline (**4**) a finalement été estimée insuffisamment réactive pour interférer lors de l'ouverture ou lors de la synthèse peptidique et n'a donc pas été protégée. Pour ce qui est de l'amine primaire, un carbamate de *tert*-butyle a pu être introduit avec des rendements quantitatifs, tandis qu'un ester de *para*-méthoxybenzyle protège la fonction acide carboxylique de l'amoxicilline (**4**). La faible stabilité de ce composé dans certaines conditions (chromatographie, température, solvant...) a pu être constatée au cours des essais de

synthèse, et le produit protégé (**160**) a pu être obtenu avec de bons rendements. Pour ce qui est de la lysine, au vu des résultats obtenus avec le monomère Lys-PG (**140**), la lysine protégée choisie a été celle sous forme d'ester d'allyle, précédemment synthétisée avec d'excellents rendements.

b) Ouverture du cycle β -lactame par la lysine

L'étape d'ouverture du cycle β -lactame de l'amoxicilline protégée (**160**) par la lysine (**102**) a donc été entreprise en s'inspirant de l'étude menée sur la pénicilline G (**7**). En premier lieu les mêmes conditions que celles appliquées à la pénicilline G (**7**) ont été reproduites pour l'amoxicilline (**4**) (Tableau 24). L'amoxicilline protégée (**160**) est mise en solution avec la lysine ester d'allyle (**102**) dans du dichlorométhane à reflux avec une addition en continu de la DIEA pendant 4h. Le suivi par CCM révèle la présence du produit de départ après 8h de réaction. 0,8 Equivalent de lysine et de base sont alors ajoutés et la réaction est laissée toute la nuit à reflux. Après purification, seuls 8% du produit (**163**) sont isolés (Entrée 1, Tableau 24). Pour éviter la déprotection du groupement Fmoc sur le produit ouvert (**163**), la réaction est alors relancée avec un plus large excès de lysine et de base pour favoriser l'ouverture de l'amoxicilline (**160**) (Entrée 2, Tableau 24). Après 5h de réaction, le rendement est amélioré, mais reste cependant faible. Un chauffage prolongé de deux heures permet d'augmenter significativement le rendement (Entrée 3, Tableau 24). L'influence des quantités de lysine et de base a alors été étudiée : un léger excès (1,4 équivalent) de lysine et de base conduit au produit d'addition avec un rendement moins bon (Entrée 4, Tableau 24). Un excès de 2,1 équivalents de base et de lysine sera donc finalement préféré. Pour tenter d'obtenir de meilleurs rendements en adduit Lys-AX, le chlorure de 9-fluorénylméthoxycarboxyle est introduit en fin de réaction pour reprotéger l'amine proximale de la partie lysine du produit (**163**), compensant la perte du groupement N^2 -Fmoc. Après 6h de réaction suivant l'ajout du Fmoc-Cl, les rendements sont augmentés (Entrées 5 et 6, Tableau 24). Le meilleur rendement étant atteint lors de l'utilisation de 2,1 équivalents de lysine et de base (Entrée 6, Tableau 24). Par contre, lorsque le temps de la réaction est diminué, les rendements obtenus sont un peu moins bons (Entrée 7, Tableau 24). Nous avons également évalué la nature de la base, en testant le 1,8-bis(diméthylamino)naphtalène, plus connu sous le nom d'éponge à proton (EP).²⁶⁵ Sa basicité est plus forte que celle de la DIEA, par contre cette base très encombrée pourrait permettre une libération de la lysine sous sa forme N^6 -NH₂ plus lente que lors de l'utilisation de la DIEA. L'éponge à proton est introduite en une seule portion au début de la réaction, qui est ensuite mise à reflux pendant 7h. En présence de 2,1 ou de 1,4 équivalents d'éponge à proton, les résultats sont proches de ceux obtenus pour la DIEA. Inversement, la réaction donne un meilleur rendement lorsque les quantités de lysine et de base sont en léger excès (Entrées 8 et 9, Tableau 24). L'éponge à proton libérerait donc plus rapidement la lysine de son sel que la DIEA, entraînant le clivage du groupement N^2 -Fmoc. De plus, lors de l'ajout de Fmoc-Cl en fin de réaction, les rendements sont moins bons que sans l'ajout de ce réactif. Dans ces conditions, il semble que la cinétique de déprotection du groupement N^2 -Fmoc soit supérieure à celle de sa re-protection. Malgré les résultats modestes, la DIEA reste donc la base de choix pour cette réaction.

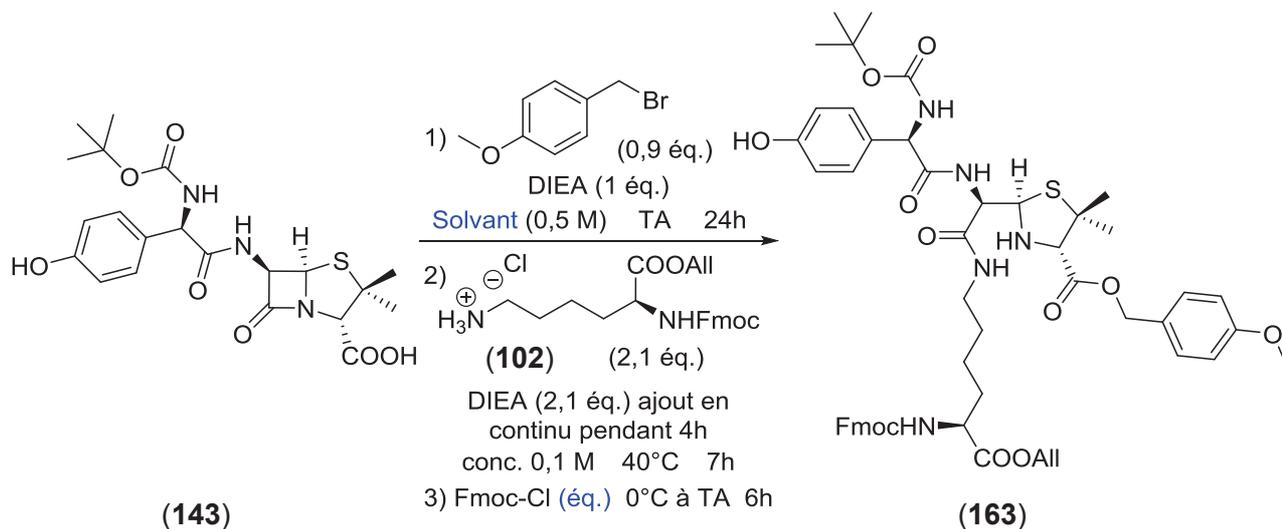


Entrée	Eq. AX/Lys	Base (éq.)	Temps 1	Eq. Fmoc-Cl	Temps 2	Rdt
1	1/1,1 + 0,8	DIEA (1,1 + 0,8)	23h	0 éq.	-	8%
2	1/2,1	DIEA (2,1 éq.)	5h	0 éq.	-	17%
3	1/2,1	DIEA (2,1 éq.)	7h	0 éq.	-	47%
4	1/1,4	DIEA (1,4 éq.)	7h	0 éq.	-	30%
5 ^a	1/1,4	DIEA (1,4 éq.)	7h	1 éq.	6h	45%
6 ^a	1/2,1	DIEA (2,1 éq.)	7h	1 éq.	6h	68%
7 ^a	1/2,1	DIEA (2,1 éq.)	7h	1 éq.	2h	61%
8	1/2,1	EP (2,1 éq.)	7h	0 éq.	-	38%
9	1/1,4	EP (1,4 éq.)	7h	0 éq.	-	44%
10 ^a	1/2,1	EP (2,1 éq.)	7h	1 éq.	6h	30%
11 ^a	1/1,4	EP (1,4 éq.)	7h	1 éq.	6h	25%

a : après 7h, addition du Fmoc-Cl à 0°C puis agitation à température ambiante

Tableau 24 : Optimisation de l'ouverture du cycle β -lactame de l'amoxicilline protégée (160) par la lysine protégée en ester d'allyle (102)

Lors de la protection de la fonction acide carboxylique de l'amoxicilline *N*-Boc (**143**), la possibilité de perdre du produit (**160**) lors des nombreux lavages permettant l'élimination du DMF est mise en avant. Pour expérimenter cette possibilité, des essais de protection de l'amoxicilline protégée par un carbamate de *tert*-butyle (**143**) sont réalisés en monotope avec des essais d'ouverture du cycle β -lactame (Tableau 25). Pour ce faire deux solvants ont été testés : le DMF et le DCM. Les conditions entreprises pour l'ouverture de l'amoxicilline (**160**) sont celles pour lesquelles les meilleurs rendements avaient été obtenus pour les essais en deux étapes avec et sans l'ajout du Fmoc-Cl. Ces deux solvants ont montré les mêmes résultats lors de la synthèse sans ajout de Fmoc-Cl, à savoir un rendement en monotope sur deux étapes de 27 et 26% (Entrées 1 et 2, Tableau 25). Néanmoins, le rendement obtenu pour les deux étapes consécutives est de 31%, la synthèse en monotope ne conduit donc pas à une amélioration du rendement. La synthèse monotope est tout de même réalisée avec l'ajout de Fmoc-Cl. Un rendement de 33% sur les deux étapes est obtenu (Entrée 3, Tableau 25). Encore une fois, le rendement obtenu sur deux étapes réalisées consécutivement étant de 45% la synthèse par étapes successives sera préférée.



Entrée	Solvant	Eq. Fmoc-Cl	Rdt	Rdt en 2 étapes séparées
1	DMF	0 éq.	27%	0,66 x 0,47 = 31%
2	DCM	0 éq.	26%	0,66 x 0,47 = 31%
3	DCM	1 éq.	33%	0,66 x 0,68 = 45%

Tableau 25 : Optimisation de la protection en ester de *para*-méthoxybenzyle de l'amoxicilline *N*-Boc (143) puis son ouverture par la Fmoc-Lys-OAll (102) en monotope

Après cette optimisation, le meilleur rendement obtenu en adduit Lys-AX (**163**) est donc de 68%, et une synthèse multiétape est préférable à une synthèse monotope. Une attention particulière a été portée à la possible épimérisation du produit (**163**) lors de sa formation. Des analyses LC-MS sont donc effectuées sur des bruts réactionnels et certains des produits purifiés. Aucune épimérisation n'est observée. La Figure 28 ci-après montre les chromatogrammes LC-MS avec une détection UV à 265 nm et le TIC (total ion current) des bruts réactionnels correspondant aux Entrées 3 et 6 du Tableau 24. Le produit attendu (**163**) est respectivement détecté à 21,5 et 21,7 min, et l'excès de lysine (**102**) à 11,2 et 11,5 min. Sur les chromatogrammes (A), correspondant à la synthèse sans l'ajout de Fmoc-Cl, un pic à 11,7 min est détecté, présentant une masse de 771 g/mol ce qui correspond à la masse du produit souhaité dépourvu du groupement *N*²-Fmoc (**164**) (993-222 g/mol). Lorsque la même synthèse est réalisée avec l'ajout de Fmoc-Cl (chromatogrammes B, Figure 28), le produit dépourvu du groupement *N*²-Fmoc (**164**) n'est plus détecté, ni sur le chromatogramme à détection UV à 265 nm, ni sur le chromatogramme du TIC, indiquant que l'ajout de Fmoc induit bien la re-protection du produit (**164**) en produit souhaité (**163**). Cependant, un co-produit (**165**) a pu être observé à un temps de rétention de 24,3 minutes, présentant une masse de 1 215 g/mol, ce qui correspond au produit ouvert incrémenté d'un groupement Fmoc (993+222 g/mol). Ce produit (**165**) est présent à hauteur de 20% par rapport au produit désiré (**163**) (ratio RMN) (Figure 28).

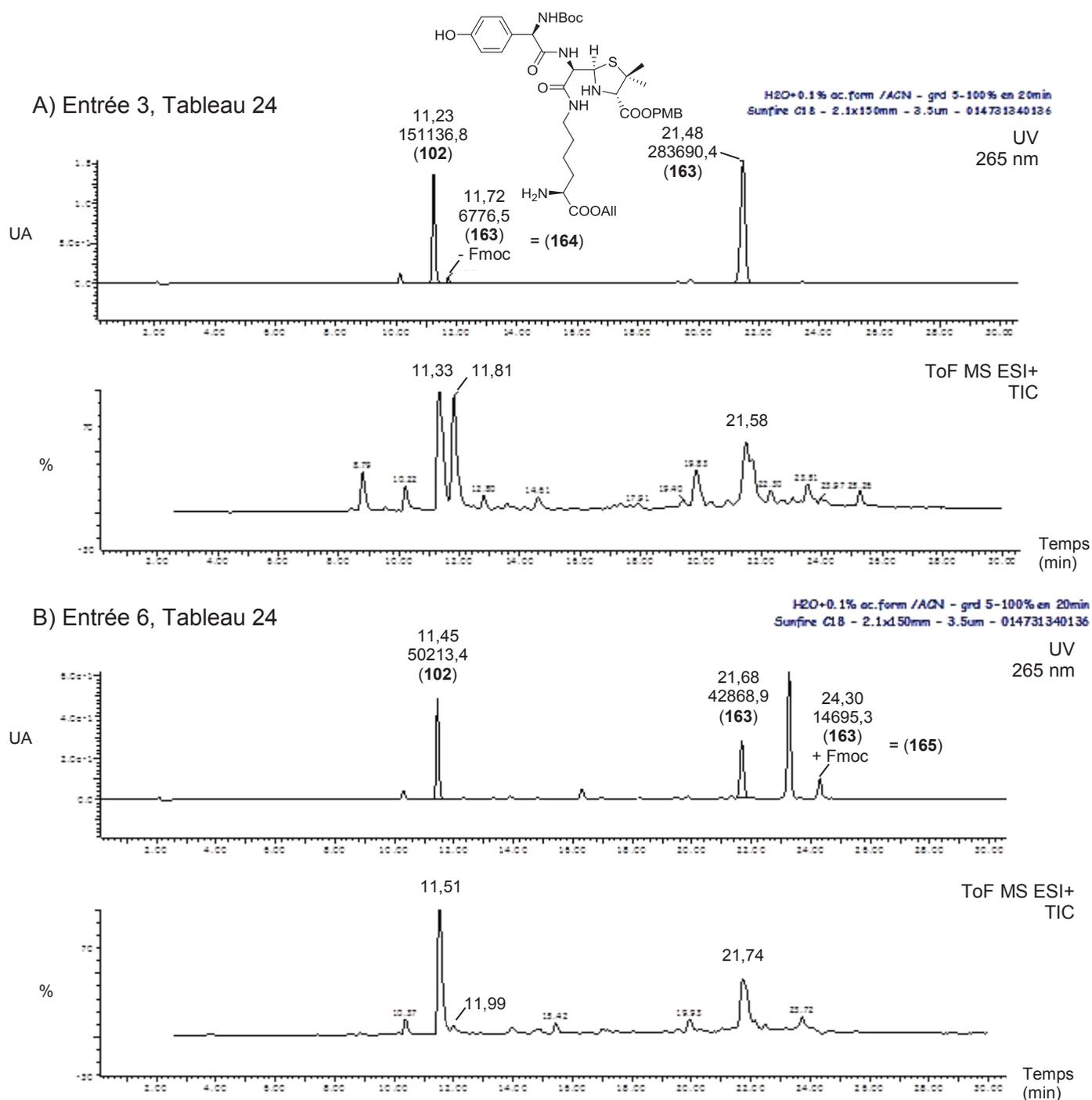


Figure 28 : Chromatogrammes UV à 265 nm et TIC des bruts réactionnels des synthèses présentées aux Entrées 3 (A) et 11 (B) du Tableau 24

Le composé di-Fmoc (**165**) est inséparable du produit mono-Fmoc (**163**) par chromatographie sur gel de silice. Les RMN ¹H montrent des signaux entièrement superposés entre le produit mono-Fmoc (**163**) et le di-Fmoc (**165**), ne permettant pas de déterminer sa structure. Cependant, le second groupement Fmoc est probablement situé sur l'amine secondaire de la thiazolidine de l'amoxicilline (Figure 29).

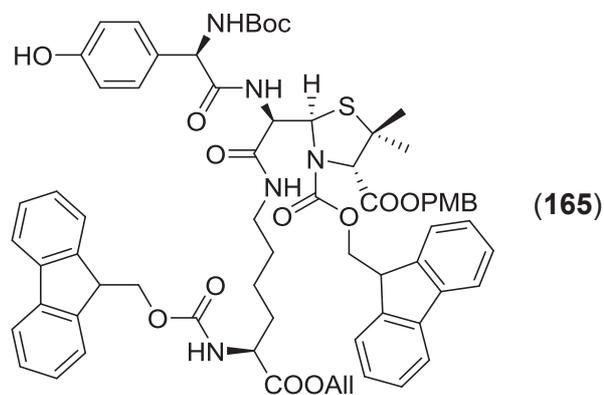


Figure 29 : Structure chimique hypothétique du produit secondaire di-Fmoc (165)

Ce groupement Fmoc pourrait ne pas être gênant pour la suite du projet étant donné que le monomère est clivé de son groupement N^2 -Fmoc lors de la synthèse peptidique. Mais, pour ne pas se retrouver avec les mêmes problèmes de déprotection que lors de la synthèse des peptides avec le monomère Lys-PG protégé par un carbamate de benzyle sur l'amine de la thiazolidine (**137**), des essais de déprotection des groupements Fmoc vont être réalisés avant d'engager le monomère Lys-AX di-Fmoc dans la synthèse peptidique. Dans un premier lieu le groupement allyle va être clivé, permettant d'effectuer en second temps les tests de déprotection des groupements Fmoc sur le mélange de monomère mono- et di-Fmoc, (**166**) et (**167**).

c) Clivage du groupement allyle

En premier lieu la déprotection de la fonction allyle est réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'obtention du monomère Lys-PG (**140**), dans un mélange de solvant dichlorométhane/éthanol (2/1) (*cf.* Schéma 65 p.138). Dans ces conditions de solvant le produit de départ est récupéré.

Tsukamoto a montré que la nature du solvant pourrait influencer drastiquement la vitesse de la réaction.²⁶⁶ Les solvants polaires aprotiques tels que le DMSO ou le 1,4-dioxane, ou les solvants polaires protiques tels que le méthanol ou l'éthanol s'avèrent être de bons solvants pour favoriser ce type de réaction. Le DMSO ou le 1,4-dioxane sont des solvants peu pratiques dans notre cas de par leur haut point d'ébullition et la nécessité d'effectuer une étape d'extraction à l'eau pour les éliminer. L'éthanol sera préféré pour notre synthèse.

La déprotection du mélange de produit ouvert par la lysine ester d'allyle mono-Fmoc (**163**) et di-Fmoc (**165**) (sur un mélange à 80/20) est effectuée en présence d'un léger excès d'acide barbiturique et de palladium tétrakis(triphénylphosphine) en quantité catalytique, dans de l'éthanol à température ambiante (Schéma 74). La cinétique de la réaction est lente comparée à celle effective pour la déprotection de la pénicilline G ouverte par la lysine ester d'allyle (**125**), mais permet d'obtenir en 16h le mélange des produits (**166**) et (**167**) (80/20) avec un bon rendement de 89% et à l'échelle du gramme.

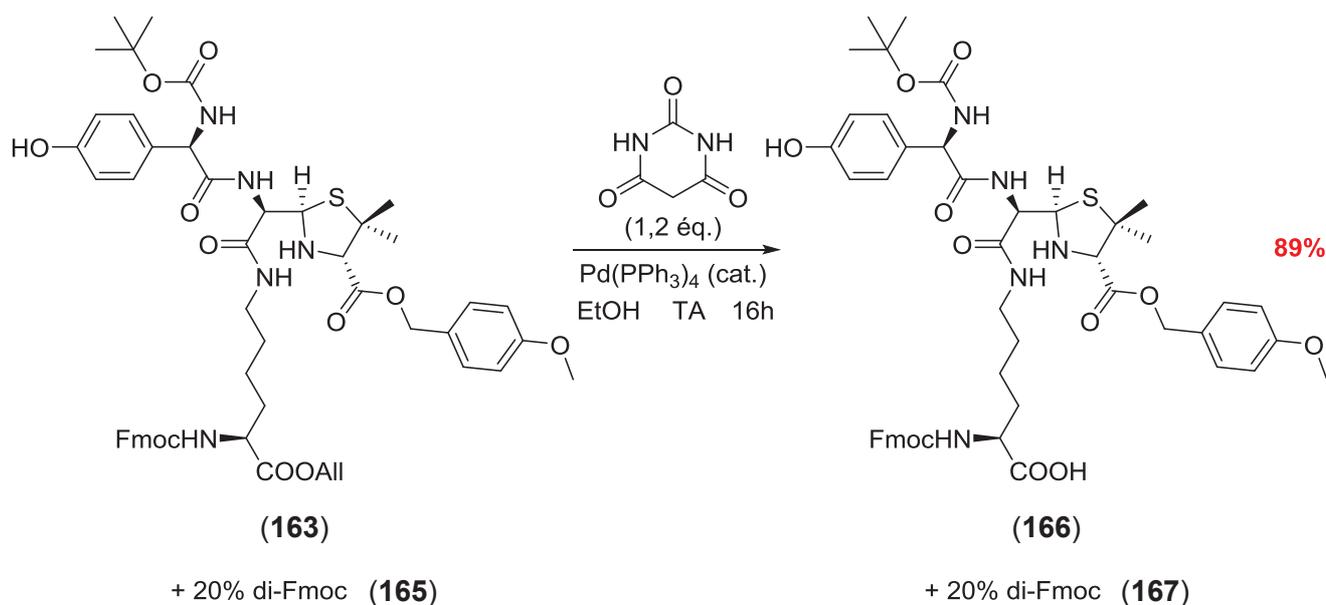


Schéma 74 : Clivage du groupement allyle sur le mélange 80/20 d'amoxicilline ouverte par la lysine en mono-et di-Fmoc (163) et (165)

La purification du produit **(166)** s'avère difficile. Une filtration sur silice permet d'éliminer une grande partie du dérivé acide barbiturique allylé et le catalyseur. Des triturations du produit dans l'éther diéthylique ont permis d'obtenir le produit désiré mono-Fmoc **(166)** avec 20% de composé di-Fmoc **(167)**. Pour les lots de déprotection qui ont été réalisés sur le produit mono-Fmoc **(163)** pur, le monomère **(166)** est obtenu avec des rendements autour de 90% et des puretés allant de 92 à 95%.

d) Clivage des groupements 9-fluorénylméthoxycarbone

Pour compléter cette étude, la labilité du monomère di-Fmoc **(167)** doit être étudiée pour assurer la valorisation de ce produit **(167)** en tant que monomère utilisable pour la synthèse des peptides sélectionnés.

La labilité du groupement carbamate de 9-fluorénylméthyle ne pose usuellement pas de problème et de nombreuses méthodes de déprotection existent.^{225,242,267} La méthode la plus connue, et usuellement utilisée, est celle employant la pipéridine dans du DMF, qui permet une déprotection effective en quelques minutes.^{242,268} Le mélange 80/20 des monomères **(166)** et **(167)** est donc mis en solution dans le DMF en présence d'un excès de pipéridine (Schéma 75). En 45 minutes la conversion des deux produits est totale, conduisant au produit déprotégé **(168)** avec un rendement de 87% calculé sur la base du mélange 80/20. La pureté de ce produit **(168)** est de 97%.

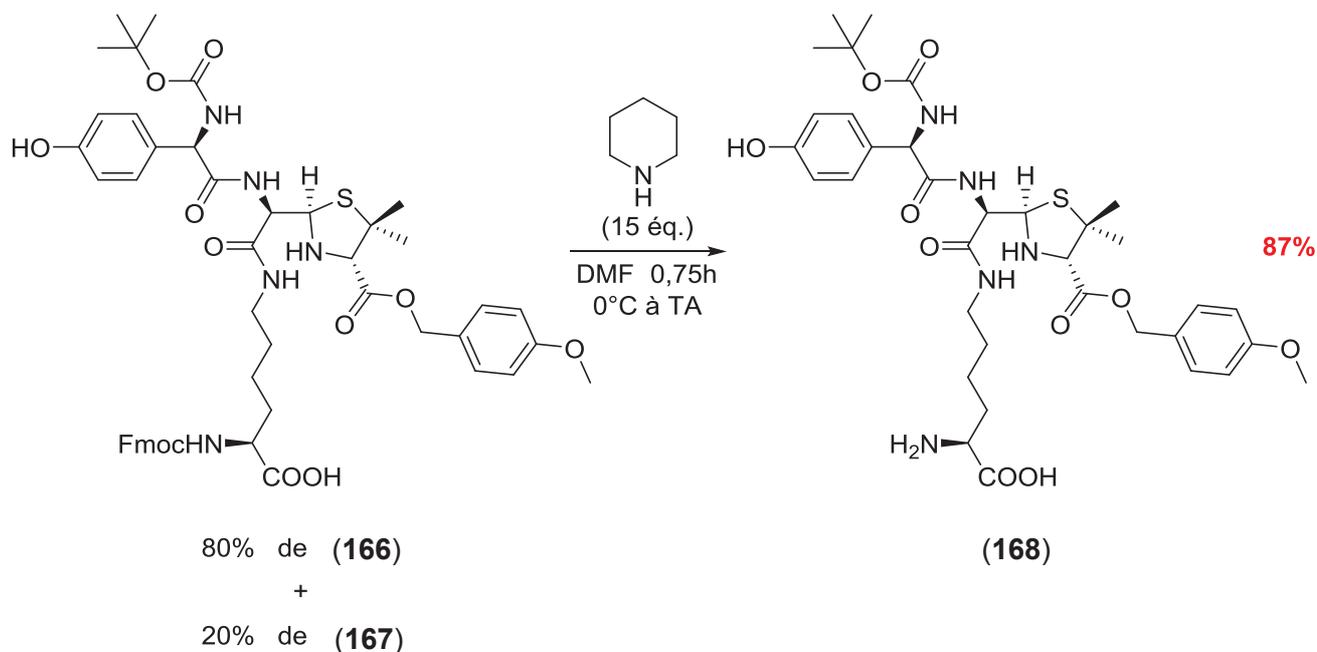


Schéma 75 : Déprotection des groupements Fmoc du mélange 80/20 des monomères mono- et di-Fmoc (**166**) et (**167**)

Le mélange des monomères (**166**) et (**167**) ayant été convenablement déprotégé de ses groupements 9-fluorénylméthoxycarbonyles, le monomère (**166**) peut donc être utilisé en mélange avec le produit di-Fmoc (**167**) pour effectuer la synthèse des peptides sélectionnés.

e) Conclusion sur la synthèse du monomère Lys-AX

En conclusion le monomère Lys-AX (**166**) a pu être synthétisé en 5 étapes avec un rendement global de 47%. La première étape consiste en la protection de la fonction amine primaire de l'amoxicilline commerciale (**4**) en carbamate de *tert*-butyle, conduisant au produit (**143**) avec un rendement quantitatif. Après le constat de la faible réactivité du phénol de l'amoxicilline (**4**), seule la fonction acide carboxylique a été protégée avec, comme pour l'étude sur la pénicilline G (**7**), un groupement *para*-méthoxybenzyle. Après une optimisation des conditions de protection et de purification du produit (**160**), très peu stable, un rendement de 77% a pu être atteint. L'ouverture de l'amoxicilline (**160**) avec la lysine ester d'allyle (**102**) a été optimisée sur la base des observations réalisées grâce à l'étude préliminaire sur l'ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline G protégée en ester de *para*-méthoxybenzyle (**100**). Une amélioration a pu être apportée en ajoutant en fin de synthèse du Fmoc-Cl. Le produit ouvert (**163**) a donc pu être isolé avec un bon rendement de 68%. Aucune épimérisation du produit souhaité (**163**) n'a été observée. Par contre un produit secondaire de double protection par le groupement 9-fluorénylméthoxy-carbonyle (**165**) a été observé à hauteur de 20% par rapport au produit mono-Fmoc (**163**). La déprotection de l'ester d'allyle sur la partie lysine des composés (**163**) et (**165**) a ensuite été réalisée avec de très bons rendements. Toutes les étapes ont pu être optimisées à l'échelle du gramme (Schéma 76).

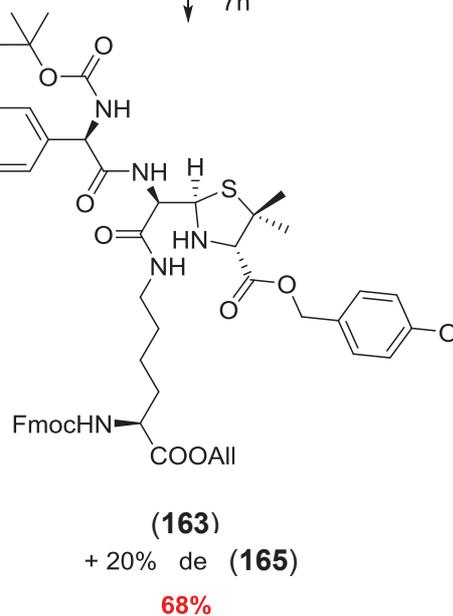
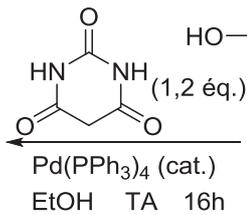
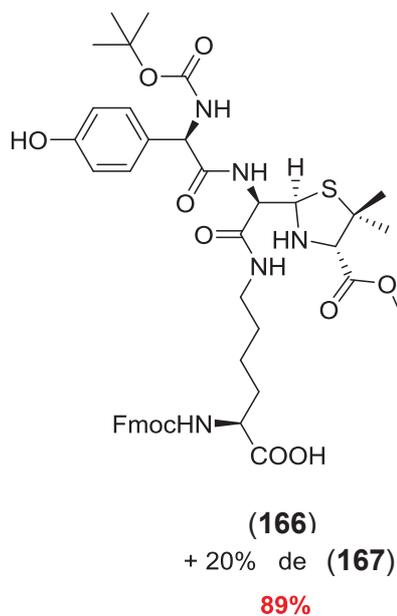
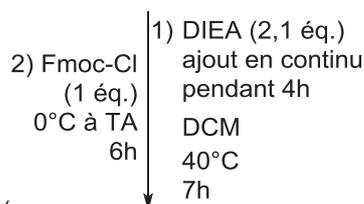
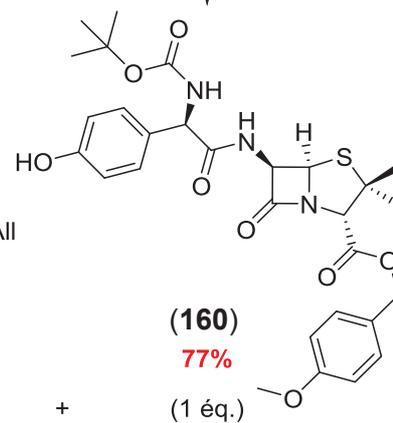
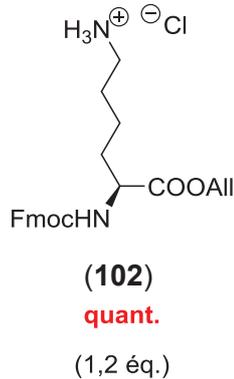
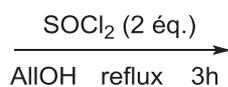
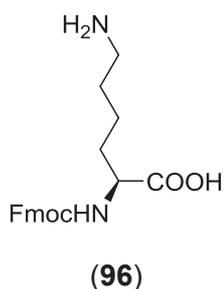
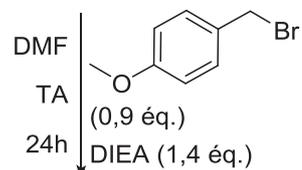
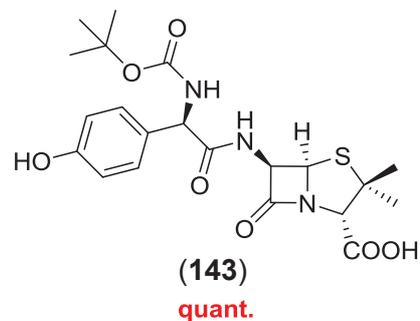
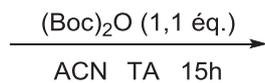
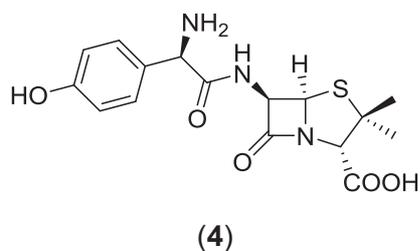


Schéma 76 : Récapitulatif de la synthèse du monomère Lys-AX (166)

En second lieu, la déprotection des groupements 9-fluorénylméthoxycarbonyles a été expérimentée sur un mélange de monomères pour s'assurer de la bonne déprotection du produit secondaire (**167**). Celui-ci a été effectivement déprotégé en même temps que le monomère mono-Fmoc (**166**) conduisant au produit déprotégé (**168**) avec un bon rendement et une excellente pureté. Le mélange de monomères (**166**) et (**167**) peut donc être utilisé tel quel pour la synthèse des 9 peptides sélectionnés pour l'étude sur l'amoxicilline (**4**). A l'heure actuelle, la société Proteogenix effectue la synthèse des peptides, un peptide sur les 9 est synthétisé, attestant la viabilité du mélange de monomères (**166**) et (**167**).

3) Conclusion sur la synthèse des monomères Lys-PG et Lys-AX

Les synthèses des deux monomères Lys-PG (**140**) et Lys-AX (**166**) ont été axées autour d'une stratégie de protection et de déprotection orthogonales. Chacun des groupements protecteurs a été judicieusement choisi par rapport à la stratégie de synthèse utilisée pour les peptides. L'étape limitante de ces synthèses est celle d'ouverture du cycle du β -lactame. Les synthèses des deux monomères ont été optimisées avec succès et à l'échelle du gramme : le monomère Lys-PG (**140**) est obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 34%, tandis que le monomère Lys-AX (**166**) est synthétisé en 5 étapes avec un rendement global de 47%. Ces monomères peuvent être introduits dans les synthèses peptidiques confirmant la viabilité de la stratégie mise en place de formation d'un monomère intégrable dans une synthèse peptidique classique.

IV. Conclusion

En conclusion de cette étude sur les pénicillines, la stratégie mise en place a été de déterminer quels acides aminés étaient hapténisés *in vitro* par la pénicilline G (**7**) et par l'amoxicilline (**4**) *via* des analyses de spectrométrie de masse sur des bioconjugués entiers ou digérés par des enzymes. Cette étape a permis d'identifier 12 lysines hapténisées par la pénicilline G (**7**) et 10 hapténisées par l'amoxicilline (**4**) dans des conditions de couplage à pH physiologique. Suivant des comparaisons avec les données de la littérature contenant des résultats acquis d'après des études *in vivo*, 12 sites ont été sélectionnés pour continuer l'étude sur la pénicilline G (**7**) et 8 pour celle sur l'amoxicilline (**4**) (*cf.* Tableau 8 p.103).

La deuxième étape consistait en la sélection des peptides potentiellement immunogènes. Deux techniques de prédiction *in silico* ont alors été entreprises pour estimer les interactions possibles entre tous les peptides modélisés et les poches des molécules HLA des cellules dendritiques,

présentatrices des épitopes aux lymphocytes T, pour les 7 allèles les plus représentatifs de la population caucasienne. Parmi les 180 peptides possibles 14 ont pu être sélectionnés dans le but de les synthétiser (*cf.* Tableau 10 p.107).

La troisième étape a consisté en la synthèse du monomère Lys-PG (**140**) et Lys-AX (**166**) en vue de leur introduction dans la synthèse peptidique. Les deux monomères ont pu être synthétisés respectivement en 4 et 5 étapes avec de bons rendements globaux et réalisables à l'échelle du gramme. Les 14 peptides sélectionnés ont donc pu être synthétisés par la méthodologie Fmoc, par la société Proteogenix, avec le monomère Lys-PG (**140**) et testés biologiquement sur des lymphocytes T pour évaluer leur capacité à activer le système immunitaire. Pour ce qui est du monomère Lys-AX (**166**), les synthèses peptidiques sont en cours, jusqu'à ce jour, un peptide parmi les 9 est synthétisé. Les tests biologiques n'ont pas encore été entrepris pour cette partie du projet.

V. Tests biologiques des peptides synthétisés

Les tests biologiques sont réalisés par Marie Eliane Azoury, en doctorat avec le Pr Marc Pallardy au sein de l'unité INSERM UMR-S 996 à la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. A partir de poches de sang total de donneurs sains anonymes, issues de l'établissement français du sang, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, lymphocytes et monocytes) sont isolées par la technique de séparation sur gradient de Ficoll. Les monocytes sont isolés à partir des PBMC par adhérence sur des surfaces en plastique, puis différenciés en cellules dendritiques immatures en présence du facteur de croissance des granulocytes et macrophages (GM-CSF) et d'IL-4 humain recombinant pendant 4 jours. Les cellules dendritiques sont par la suite maturées en utilisant des lipopolysaccharides (LPS). Les lymphocytes T CD4⁺ totaux (rassemblant les naïfs et les mémoires) sont isolés à partir des PBMC par une sélection magnétique positive en utilisant des microbilles magnétiques couplées à un anticorps monoclonal anti-CD4. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4⁺ CD45RA⁺) sont, quant à eux, isolés des PBMC par une sélection négative en utilisant des microbilles spécifiques. Afin de stimuler les lymphocytes T, les cellules dendritiques matures sont chargées par des peptides hapténisés par la pénicilline ou non (contrôles négatifs), ce qui leur permet de les présenter *via* leurs molécules HLA. Les cellules dendritiques chargées sont ensuite mises en co-culture avec des lymphocytes T CD4⁺ (totaux ou uniquement les naïfs) autologues, dans des plaques de 96 puits, afin de présenter le complexe HLA-peptide aux récepteurs des lymphocytes T et de les stimuler. Trois restimulations des lymphocytes T CD4⁺ avec les cellules dendritiques matures chargées sont effectuées, suivies par un ELISpot à interférons- γ permettant d'évaluer la réponse T spécifique aux peptides hapténisés. Les lymphocytes qui réagissent au contact des cellules dendritiques chargées sont cultivés dans un environnement cytokinique qui favorise la sécrétion d'interféron- γ en cas d'activation immunitaire. Une réponse immunitaire est considérée comme

positive si la quantité d'interféron- γ est deux fois plus élevée que la quantité détectée lors des contrôles négatifs au cours desquels les cellules dendritiques sont stimulées avec les mêmes peptides mais non hapténisés (Schéma 77).^{38,269}

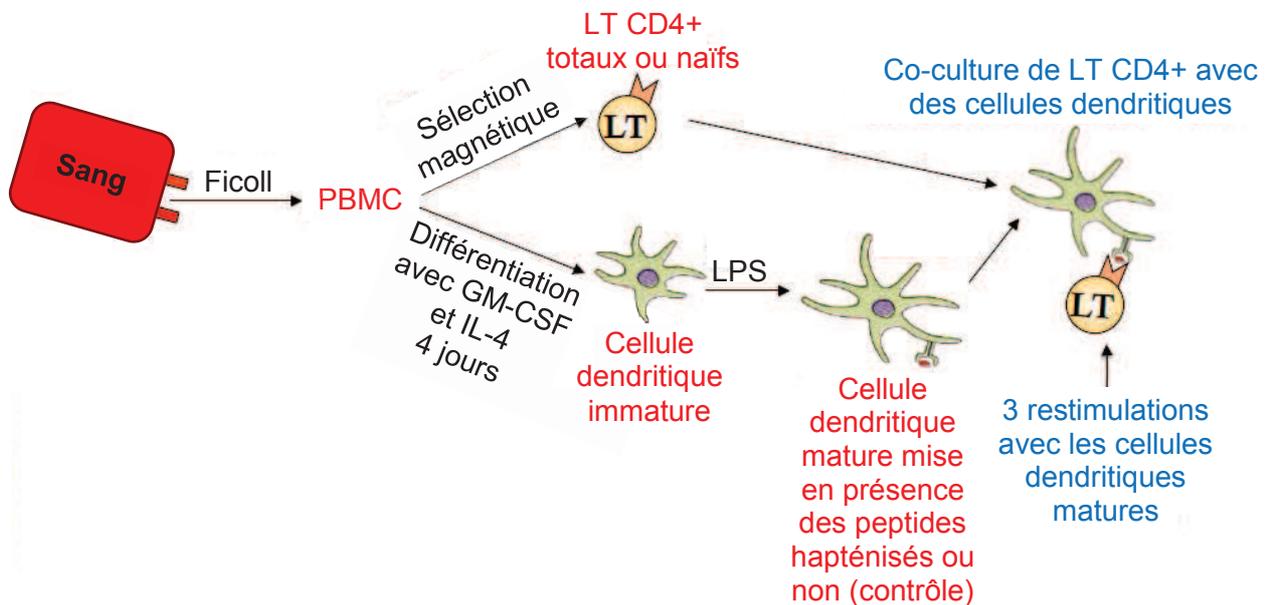


Schéma 77 : Protocole d'évaluation de l'immunogénicité des peptides, breveté par Bernard Maillère et Stéphanie Delluc Desroches²⁶⁹

L'application de cette méthode a été effectuée sur 12 des 14 peptides sélectionnés pour l'étude sur les pénicillines. Tous ces peptides ont été synthétisés *via* l'utilisation du monomère Lys-PG (**140**). La capacité de ces peptides à activer le système immunitaire a été, jusqu'à maintenant, testée par Marie Eliane Azoury sur les lymphocytes T totaux pour 9 donneurs et sur les lymphocytes T naïfs pour 4 donneurs. Les résultats sont présentés dans le Tableau 26 ci-après. Le peptide présentant les meilleurs résultats en termes d'activation de la réponse immunitaire est le PT-15, qui répond pour 10 patients sur 13, que ce soit en présence de lymphocytes T totaux ou naïfs, s'en suit le FS-15 puis le KV-15. Ces trois peptides présentent de bons percentiles ainsi que de bonnes orientations d'après la modélisation effectuée avec le logiciel IEDB. De plus, les résultats de la modélisation par dynamique moléculaire sont également bons et concordent, pour la plupart, avec la modélisation IEDB (*cf.* Tableau 13 p.112). Pour ce qui est des peptides LK-15, SF-15, TG-15 et VC-15, les résultats des tests d'activation du système immunitaire sont négatifs. Ces observations corrélerent avec les résultats de la modélisation moléculaire effectuée *via* le logiciel IEDB ainsi qu'avec les dynamiques moléculaires. Pour ces quatre peptides les résultats sont souvent divergents entre les deux techniques de modélisation, et de faibles probabilités d'accroche sont prédites (*cf.* Tableau 13 p.112). Les peptides LF-15 et VL-15, quant à eux, présentent des résultats moyens n'ayant activé le système immunitaire que pour 3 des 12 patients testés. Par contre, ces deux peptides présentent de bons résultats de modélisation moléculaire. leurs prédictions IEDB et leurs modélisations par dynamique moléculaire concordent (*cf.* Tableau 13 p.112). Ces deux exemples montrent la limite des

modélisations moléculaires et rappellent que seuls les tests biologiques permettent d'attester de l'effectivité d'un peptide à activer le système immunitaire. Pour compléter ces résultats, le génotypage de chaque patient doit être réalisé pour comparer au mieux les résultats biologiques et les prédictions de modélisation moléculaire en fonction de l'allèle de la poche du HLA impliqué, ce travail fait partie de la thèse de Marie Eliane Azoury.

Nom du peptide	Peptide hapténisé par la PG	Résultats	
		LT totaux	LT naïfs
LF-15	LKK ₁₃₇ YLYEIARRHPYF	2/8	1/4
PT-15	PELLFFAK ₁₅₉ RYKAAFT	6/9	4/4
LK-15-1	LRDEGK ₁₉₀ ASSAKQRLK	0/8	0/2
LK-15-2	LRDEGKASSAK ₁₉₅ QRLK	0/8	0/2
LK-15-3	LRDEGKASSAKQRLK ₁₉₉	0/8	0/2
SF-15-1	SSAK ₁₉₅ QRLKCASLQKF	0/8	0/2
SF-15-2	SSAKQRLK ₁₉₉ CASLQKF	1/8	0/2
FS-15	FGERAFK ₂₁₂ AWAVARLS	4/9	1/4
VL-15	VVLLRLAK ₃₅₁ TYETTL	2/8	1/4
TG-15	TPTLVEVSRNLGK ₄₃₂ VG	1/8	0/4
VC-15	VEVSRNLGKVGSK ₄₃₆ CC	1/8	0/4
KV-15	KERQIKK ₅₂₅ QTALVELV	3/9	1/4

Tableau 26 : Résultats des tests biologiques effectués sur 12 peptides hapténisés par la pénicilline G sur la lysine numérotée, synthétisés via l'utilisation du monomère Lys-PG (140) (Marie Eliane Azoury, communications personnelles)

La comparaison entre les résultats obtenus lorsque les tests sont réalisés sur les lymphocytes T totaux et lorsqu'ils sont réalisés sur les naïfs, prouve que la réponse immunitaire est bien induite par les lymphocytes T naïfs. Or ces derniers n'ont jamais été en contact avec la pénicilline. Ces résultats montrent donc que ces tests d'activation des lymphocytes peuvent être l'objet de nouveaux tests diagnostic de l'allergie, qui pourraient être réalisés avant le premier contact avec l'antigène.

CHAPITRE II : IDENTIFICATION DE PEPTIDES IMMUNOGENES ISSUS DU SULFAMETHOXAZOLE

L'étude de l'allergie au sulfaméthoxazole a été abordée avec la même méthodologie que celle développée pour les pénicillines. Pour mimer au plus près le vivant, les acides aminés de la HSA hapténisés par le SMX seront dans un premier temps identifiés. Une sélection de peptides potentiellement immunogènes sera alors entreprise grâce aux méthodes de prédiction *in silico*. En dernier lieu, la synthèse des peptides sélectionnés sera approchée par le biais de la synthèse d'un monomère cystéine-sulfaméthoxazole.

I. Etude de l'hapténisation de la HSA par le sulfaméthoxazole

Le sulfaméthoxazole (**5**) est un pro-haptène.^{67,133,135-137} Sa métabolisation libère un dérivé nitroso SMX-NO (**54**), qui est capable de réagir avec les résidus nucléophiles thiol.^{158,159} Plusieurs publications relatent de l'hapténisation des résidus cystéines des protéines du sérum par le SMX-NO (**54**),^{67,133,135-137,157} et plus particulièrement de la cystéine 34 de la HSA.^{23,135,136,161,162} D'autres études sur des nitrosoaryles hapténisant la cystéine 34 de la HSA par le même mécanisme que le SMX (**5**) mettent en avant la formation d'un dérivé sulfinamide (peu stable au chauffage, aux acides...). Ce dernier subirait une oxydation pour conduire au dérivé sulfonamide plus stable (*cf.* Schéma 25 p.66).^{138,163} Au cours de leur étude, Callan et ses collaborateurs n'ont pas observé la formation du dérivé sulfinamide mais seulement du dérivé *N*-hydroxysulfinamide, probablement à cause d'un traitement à chaud qu'ils effectuent avant leurs analyses et qui aurait pu dégrader le sulfinamide. Deux méthodes différentes pour obtenir des bioconjugués avec la HSA sont décrites dans la littérature, selon que la protéine soit incubée avec le SMX-NO (**54**) ou avec le dérivé hydroxylamine.^{135,163} En vue de synthétiser des monomères HSA-SMX, les métabolites du SMX : l'hydroxylamine (**53**) et le nitroso (**54**) vont dans un premier lieu être synthétisés.

1) Synthèse des métabolites du sulfaméthoxazole

La synthèse des métabolites du sulfaméthoxazole (**5**) a déjà été décrite dans la littérature.^{159,270,271} A partir du 3-amino-5-méthylisoxazole (**46**) et du chlorure de *para*-nitrobenzylsulfonyl (**169**), le dérivé nitro du SMX (**170**) est obtenu pur après recristallisation avec un rendement de 63%.²⁷⁰ Le SMX-NO₂ (**170**) est alors réduit à l'aide d'hypophosphite de sodium et de palladium en quantité catalytique permettant d'obtenir après recristallisation le composé SMX-HA (**53**) avec une très bonne pureté de 96% et un rendement de 69%.²⁷¹ Enfin le SMX-HA (**53**) est oxydé en SMX-NO (**54**) avec du trichlorure de fer, pour cette étape les rendements n'excèdent pas 31% et la pureté maximale du produit obtenu est de 85%.²⁷¹ Au minimum, 15% des dimères azo (**171**) et azoxy (**172**) du SMX-NO (**54**) sont formés pendant la synthèse (Schéma 78).

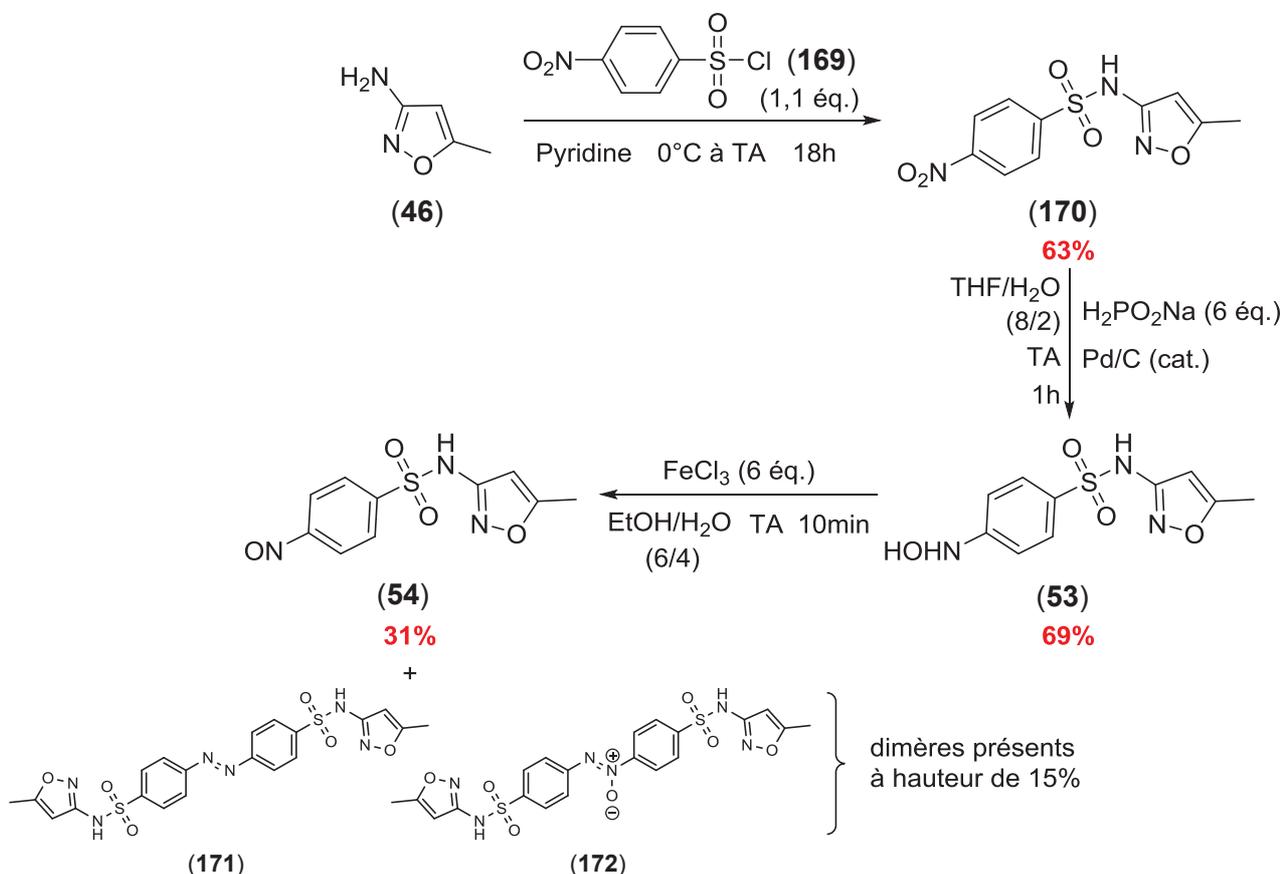


Schéma 78 : Synthèse des métabolites du SMX (**5**) : le SMX-HA (**53**) et SMX-NO (**54**)

Le métabolite hydroxylamine du SMX (**53**) est préparé en deux étapes avec un rendement global de 43% et une très bonne pureté, tandis que le dérivé nitroso (**54**) est obtenu en trois étapes avec un rendement global de 13% et une pureté acceptable mais qui diminue au cours du temps en raison de la grande réactivité des dérivés nitroso.¹⁶¹ La méthode de synthèse des bioconjugués employant le dérivé hydroxylamine (**53**) sera donc préférée.¹⁶³

2) Synthèse du bioconjugué HSA-SMX

Comme vu précédemment sur le spectre de déconvolution de masse de la HSA commerciale, plusieurs pics de masse sont présents, représentant la HSA nue ainsi que des espèces HSA modifiées (cf. Figure 19 p.91). Parmi ces dernières, la HSA cystéinylée est identifiée. Ce qui signifie que la cystéine 34 (la seule cystéine de la protéine qui n'est pas impliquée dans un pont disulfure) n'est pas présente sous sa forme –SH libre dans tout l'échantillon de HSA. Pour s'assurer d'avoir le plus de protéine possible hapténisée par l'antibiotique au niveau de la cystéine 34 et augmenter le seuil de détection lors des analyses de masse, la HSA commerciale est dans un premier temps traitée selon un mode opératoire de Turesky et ses collaborateurs.²⁷² La HSA est mise en solution dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7,4 avec 26 équivalents de β -mercaptoéthanol pendant 1h30 à température ambiante. La HSA est ensuite incubée dans une solution tamponnée à pH 7,4 avec 2,5 équivalents de SMX-HA (**53**) solubilisés dans de l'éthanol (0,25 mg/mL), pendant 18 heures à 37°C. Le bioconjugué formé est ensuite diafiltré pour éliminer l'excès de SMX-HA (**53**) qui n'aurait pas hapténisé la protéine. Pour stabiliser le bioconjugué formé, et se rapprocher des conditions biomimétiques (*in vivo* la digestion des protéines par les cellules dendritiques s'effectue en milieu acide, ce n'est donc probablement pas un dérivé sulfinamide, peu stable en milieu acide, mais plutôt un dérivé sulfonamide qui serait présenté aux lymphocytes T par les cellules dendritiques.^{273,274}), ce dernier est oxydé avec 50 équivalents d'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) dans une solution tamponnée à pH 7,4, pendant 6 heures à température ambiante.¹⁶³ L'excès de *m*-CPBA et l'acide benzoïque formé sont éliminés par diafiltrations. Le succès de l'hapténisation est ensuite contrôlé par western blot. Cependant, les anticorps anti-sulfaméthoxazole n'étant pas disponibles au laboratoire, la révélation du western blot obtenu est réalisée avec du rouge de ponceau, révélateur spécifique des protéines (Figure 30).

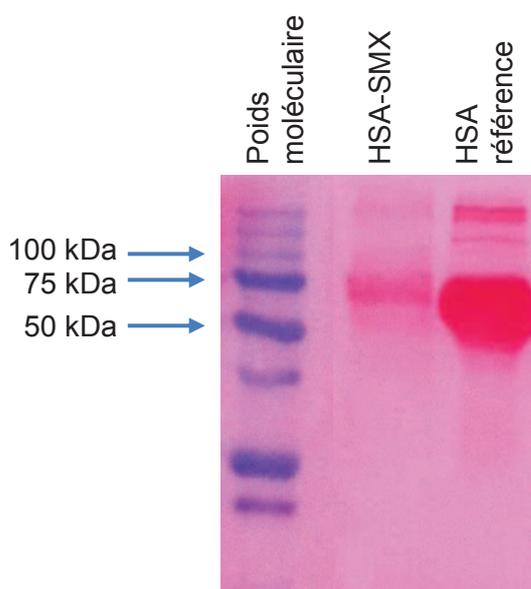


Figure 30 : Western blot du bioconjugué HSA-SMX révélé au rouge de ponceau (9 μ g de bioconjugué HSA-SMX ont été déposés et 30 μ g pour l'échantillon HSA de référence)

Avec ce révélateur l'efficacité de l'hapténisation ne peut être vérifiée, puisque non spécifique du sulfaméthoxazole (**5**). La protéine de référence, non hapténisée, est détectée, comme le témoigne la tâche rouge située autour de 67 kDa sur la Figure 30. Le bioconjugué HSA-SMX présente également une tâche rouge aux alentours de 67 kDa montrant que la protéine ne s'est pas dégradée au cours des traitements. La tâche est moins intense, ceci s'explique par la quantité de bioconjugué déposée sur le western blot (9 µg pour le bioconjugué HSA-SMX au lieu de 30 µg pour la HSA de référence). Par contre, l'écart de masse entre le bioconjugué HSA-SMX et la HSA de référence n'est pas discernable du fait de la faible différence de masse (au maximum de 0,284 kDa) entre la HSA de référence et le bioconjugué monohapténisé sous forme de sulfonamide HSA-SMX. Cet écart n'est pas suffisamment important pour être remarqué sur le western blot.

Les analyses de masse de ce bioconjugué HSA-SMX sont encore en cours et ne seront donc pas présentées dans cette thèse. Néanmoins, l'acide aminé hapténisé est déjà connu : la cystéine 34 de la HSA. Qui plus est, de par la structure tridimensionnelle de la HSA, la cystéine a été détectée comme ayant un faible pKa de 6,5 (au lieu de 8,0) à pH physiologique. Ceci s'explique par le fait que cette fonction interagit avec des adduits ionisables tels que l'asparagine 38, l'histidine 39 et la tyrosine 84, qui lui permettent de rester sous cette forme –SH.¹³⁸ La suite de l'étude sera entreprise avec l'hypothèse que la cystéine 34 est hapténisée.

3) Conclusion

Dans le but de mimer le couplage *in vivo* entre la HSA et le SMX, les métabolites réactifs de ce dernier, le SMX-HA (**53**) et le SMX-NO (**54**), ont été synthétisés respectivement en deux et trois étapes avec 43 et 13% de rendements globaux. La faible stabilité du dérivé nitroso (**54**) en solution a conduit à la formation de dimères azo (**171**) et azoxy (**172**) du SMX, toujours présents en mélange avec le produit, même après recristallisation.¹⁶¹ La méthode de synthèse des bioconjugués a donc été réalisée selon la stratégie décrite par Peng et Turesky : la HSA est incubée avec un dérivé hydroxylamine, puis l'adduit est oxydé dans le but de stabiliser la liaison cystéine-SMX sous la forme d'un lien sulfonamide résistant aux conditions utilisées lors des digestions trypsiques.¹⁶³

II. Sélection *in silico* des peptides potentiellement épitopes

La sélection des peptides a été uniquement réalisée par modélisation *in silico* avec le logiciel IEDB MHC-II-binding. Comme pour l'étude sur les pénicillines, des peptides de 15-mers non modifiés par le SMX ont été simulés. L'enchaînement peptidique autour de la cystéine 34 est déterminé à partir de la séquence de la HSA téléchargée sur la PDB sous le code 1AO6.²¹⁷

1) Modélisation par le logiciel IEDB MHC-II-binding

La cystéine 34 constitue l'acide aminé pivot pour la conception des 15 peptides de 15-mers. Sa position est incrémentée d'un acide aminé de la partie C-terminale à la N-terminale. La probabilité d'accroche de chaque peptide a été calculée par le logiciel IEDB en utilisant la méthode du consensus, pour les 7 allèles des HLA-DRB1 les plus représentés dans la population caucasienne (cf. Introduction partie III 2) p.67). Le Tableau 27 ci-après agence les résultats des percentiles obtenus entre chaque peptide et chaque allèle. Les minima sont mis en couleur, ainsi que les plus petites moyennes et médianes pour chaque peptide. A première vue, le peptide KC-15 semble être celui avec les meilleures probabilités d'accroche. Le peptide LF-15 constitue également un bon candidat. On peut néanmoins constater que la moyenne des percentiles pour chaque allèle est particulièrement basse pour cette série de peptide, en particulier pour l'allèle HLA-DRB1*0701, qui est le plus représentatif de la population caucasienne.

Peptide	Allèles HLA-DRB1*							Moyenne	Médiane
	0701	1101	1301	0401	0301	1501	0101		
KALVLIAFAQYLQQC*	22,93	5,82	4,98	8,60	4,37	2,30	7,66	8,17	5,40
ALVLIAFAQYLQQC*P	27,37	5,82	4,98	8,65	4,37	2,55	9,45	8,96	5,40
LVLIAFAQYLQQC*PF	21,37	5,82	4,98	9,54	4,37	4,37	18,05	8,41	5,40
VLIAFAQYLQQC*PFE	25,60	6,64	4,98	19,52	5,17	4,55	22,88	11,08	5,91
LIAFAQYLQQC*PFED	35,96	8,79	9,09	13,44	42,13	18,07	45,90	21,25	15,76
IAFAQYLQQC*PFEDH	40,29	12,35	9,71	17,57	49,58	34,76	47,71	27,38	26,17
AFAQYLQQC*PFEDHV	46,00	32,33	9,71	19,62	56,74	34,78	49,08	33,20	33,56
FAQYLQQC*PFEDHVK	56,76	38,34	9,71	18,91	59,25	41,39	51,98	37,39	39,87
AQYLQQC*PFEDHVKL	59,11	46,12	9,71	19,28	55,60	57,62	52,62	41,24	50,86
QYLQQC*PFEDHVKLV	68,53	66,58	9,71	34,61	17,32	64,61	72,62	43,56	49,61
YLQQC*PFEDHVKLVN	68,66	10,67	9,71	32,87	17,32	69,98	72,73	34,87	25,10
LQQC*PFEDHVKLVNE	77,98	10,67	14,94	48,86	23,63	79,24	89,27	42,55	36,25
QQC*PFEDHVKLVNEV	77,55	10,67	14,94	50,64	19,58	74,10	85,90	41,25	35,11
QC*PFEDHVKLVNEVT	77,24	10,67	14,94	26,71	25,99	31,78	51,23	31,22	26,35
C*PFEDHVKLVNEVTE	77,19	10,67	14,94	26,71	15,89	30,64	51,23	29,34	21,30
Min	21,37	5,82	4,98	8,60	4,37	2,30	7,66	8,17	5,40
2nd min	22,93	6,64	9,09	8,65	5,17	2,55	9,45	8,41	5,91
Moyenne	52,17	18,80	9,80	23,70	26,75	36,72	48,55	27,99	25,47
Médiane	56,76	10,67	9,71	19,52	19,58	34,76	51,23	31,22	26,17

Tableau 27 : Probabilité d'accroche des 15 peptides de 15-mers autour de la cystéine 34 (marquée d'une *) pour les 7 allèles HLA-DRB1 les plus représentés dans la population caucasienne. Les minima, pour chaque allèle, sont représentés en couleurs dégradées par ordre croissant (rouge-orange-jaune-rose-violet), et bleu pour les moyennes et médianes

L'orientation de la cystéine 34 par rapport au récepteur des lymphocytes T a ensuite été investiguée. Les « cores » pris en compte sont ceux de la méthode NN-align, sauf pour l'allèle HLA-DRB1*1301, où la seule méthode disponible (méthode de Sturniolo *et al.*) a été utilisée.^{193,218} Les positions favorables pour la cystéine 34 sont celles déjà évoquées précédemment : en partant de la position N-terminale vers la C-terminale, il s'agit des positions 2, 3, 5, 8 et -1 (position juste après le premier acide aminé du site d'ancrage), la position 5 étant préférée.¹⁷⁴

La même méthode que celle employée pour l'étude sur les pénicillines a été suivie. Cependant, pour les peptides KC-15 et LF-15 précédemment sélectionnés, pour chacun des 7 allèles, la cystéine 34 est positionnée dans la zone flanquante. D'après la publication de Stern et ses collaborateurs par rapport aux positions du peptide dans la poche du HLA favorables à une bonne orientation vers le TcR, les positions en dehors de la poche, mais proches de celle-ci (les positions -2, 10 et 11), sont encore assez contraintes pour permettre d'affirmer que l'acide aminé ne bougera pas et sera orienté vers le TcR.¹⁷⁴ Une fois ces trois positions également prises en compte, les peptides KC-15 et LF-15 sont un peu plus intéressants mais restent faiblement orientés vers le TcR. Un compromis doit donc être réalisé entre les bas percentiles et l'orientation de la cystéine 34, les 15 peptides ont alors tous été analysés au niveau de leurs « cores » pour permettre une sélection (Tableau 28).

Positions de la C34							peptide	Percentiles du peptide						
Allèles HLA-DRB1*								Allèles HLA-DRB1*						
0701	1101	1301	0401	0301	1501	0101		0701	1101	1301	0401	0301	1501	0101
-	1	-	1	-	-	-	KC-15	22,93	5,82	4,98	8,60	4,37	2,30	7,66
-	1	-	1	1	-	-	AP-15	27,37	5,82	4,98	8,65	4,37	2,55	9,45
0	1	-	1	1	-	-	LF-15	21,37	5,82	4,98	9,54	4,37	4,37	18,05
0	1	-	1	1	-	-	VE-15	25,60	6,64	4,98	19,52	5,17	4,55	22,88
0	1	1	1	1	1	1	LD-15	35,96	8,79	9,09	13,44	42,13	18,07	45,90
0	1	1	1	1	1	1	IH-15	40,29	12,35	9,71	17,57	49,58	34,76	47,71
0	1	1	1	1	1	1	AV-15	46,00	32,33	9,71	19,62	56,74	34,78	49,08
0	1	1	1	0	1	1	FK-15	56,76	38,34	9,71	18,91	59,25	41,39	51,98
0	0	1	1	0	0	1	AL-15	59,11	46,12	9,71	19,28	55,60	57,62	52,62
1	0	1	1	1	0	1	QV-15-1	68,53	66,58	9,71	34,61	17,32	64,61	72,62
1	1	1	1	1	1	1	YN-15	68,66	10,67	9,71	32,87	17,32	69,98	72,73
1	1	1	1	1	1	0	LE-15	77,98	10,67	14,94	48,86	23,63	79,24	89,27
1	1	1	1	1	1	1	QV-15-2	77,55	10,67	14,94	50,64	19,58	74,10	85,90
1	1	1	-	1	-	-	QT-15	77,24	10,67	14,94	26,71	25,99	31,78	51,23
1	1	1	-	1	-	-	CE-15	77,19	10,67	14,94	26,71	15,89	30,64	51,23

Tableau 28 : Compilation des résultats de la modélisation IEDB : les positions de la cystéine 34 et les percentiles, pour chaque allèle et chaque peptide. Pour les positions : le 1 signifie que la cystéine 34 est placée en direction du TcR, et plus particulièrement en position 5 si le 1 est en gras et bleu, le 0 signifie qu'elle est dirigée vers le HLA, et le - signifie qu'elle est en zone flanquante. Pour les percentiles : sont représentées en vert les valeurs inférieures à 15, en orange celles comprises entre 15 et 31 et en rouge celles supérieures à 31

Au vue du Tableau 28, force est de constater qu'aucun peptide ne peut répondre aux deux conditions simultanément. Le code appliqué dans le tableau est le même que pour l'étude sur les pénicillines. Les positions de la cystéine 34 dans les poches des différents HLA sont simplifiées par un modèle binaire (les 0 équivalent à une orientation vers la poche, les 1 une orientation vers de TcR, les 1 bleus et en gras représentent la position 5, et les - les positions flanquantes). Les percentiles inférieurs à 15 témoignent des meilleures probabilités d'accroche (vert), puis viennent en orange les percentiles moyens, et en rouge les percentiles trop élevés pour que l'accroche soit possible.

Les peptides KC-15 et LF-15 sont ceux avec les meilleurs percentiles. Néanmoins, le peptide AP-15 qui permet une meilleure orientation par rapport aux deux autres peptides sera préféré. Pour ce qui est des orientations, les peptides AV-15 et YN-15 sont ceux où la cystéine 34 est la mieux positionnée, avec une bonne proportion de position 5. Cependant les percentiles pour ces peptides sont élevés : la probabilité pour que les peptides se placent réellement dans les poches des différents allèles des HLA est donc très faible. 3 Allèles ont de bons percentiles pour le peptide YN-15 ce qui permet d'inclure ce peptide à la sélection. Pour ce qui est du peptide AV-15, les percentiles sont trop élevés pour le considérer. Par contre le peptide LD-15 a de meilleures probabilités d'accroche pour les allèles 1101, 0401 et 1501 et des orientations aussi bonnes que le AV-15, ce qui permet de le sélectionner. En ce qui concerne la sélection d'un peptide qui servira de contrôle négatif lors des tests biologiques, malgré son bon percentile et sa très bonne orientation (position 5) pour l'allèle HLA-DRB1*1301, le peptide AL-15 semble être suffisamment mal orienté et avoir des percentiles trop élevés pour les autres allèles, pour en faire un bon candidat.

2) Conclusion sur la sélection des peptides

Après l'analyse poussée des données obtenues lors de la modélisation *in silico* par le logiciel IEDB des 15 peptides conçus en intégrant l'enchaînement peptidique de la HSA autour de la cystéine 34, trois peptides ont été sélectionnés en vue d'être synthétisés. Il s'est avéré difficile de trouver un peptide répondant aux deux conditions (une bonne accroche dans la poche des différents HLA et une bonne orientation de la cystéine d'intérêt vers le TcR). Les avantages et les inconvénients de chacun des peptides sélectionnés sont résumés dans le Tableau 29 ci-après. Le peptide AL-15 a également été sélectionné pour servir de contrôle négatif (Tableau 29).

Peptide sélectionné	Avantages	Inconvénients
ALVLIAFAQYLQQC ₃₄ P	Bons percentiles	Zone flanquante
LIAFAQYLQQC ₃₄ PFED	Résultats moyens	Résultats moyens
YLQQC ₃₄ PFEDHVKLVN	Bonnes positions	Mauvais percentiles
AQYLQQC ₃₄ PFEDHVKL	Contrôle négatif	Bon résultat pour l'allèle 1301

Tableau 29 : Peptides sélectionnés pour la cystéine 34 avec leurs avantages et leurs inconvénients

Pour confirmer et comparer les choix des peptides, la modélisation par dynamique moléculaire reste encore à effectuer. Les résultats obtenus par cette modélisation étant plus proches du modèle *in vivo*, ils pourraient aider à rationaliser et affiner la sélection des peptides.

III. Synthèse du monomère Cys-SMX

Pour cette étude sur le sulfaméthoxazole, la synthèse des peptides sera également réalisée selon la stratégie Fmoc. Aussi, le monomère à synthétiser sera la Fmoc-Cys(SMX)-OH. La nature du lien entre la cystéine et le sulfaméthoxazole reste donc à statuer.

D'après une publication de Callan et ses collaborateurs, *in vivo* l'espèce formée lors de la réaction entre une cystéine d'une protéine et les métabolites du SMX est un *N*-hydroxysulfinamide.¹³⁵ Or si la protéine a ses cystéines sous forme de thiol libre -SH et non d'acide sulfénique -SOH, alors le dérivé obtenu devrait être dans un premier lieu un dérivé semimercaptal, qui se réarrange rapidement en sulfinamide plus stable. Par analogie, un *N*-hydroxysulfinamide pourrait se réarranger en sulfonamide plus stable (Schéma 79). De plus contrairement à Callan *et al.*, Peng et ses collaborateurs ont récemment détecté un adduit sulfonamide après une incubation *in vitro* de HSA avec le dérivé arylhydroxylamine de leur étude.¹³⁸

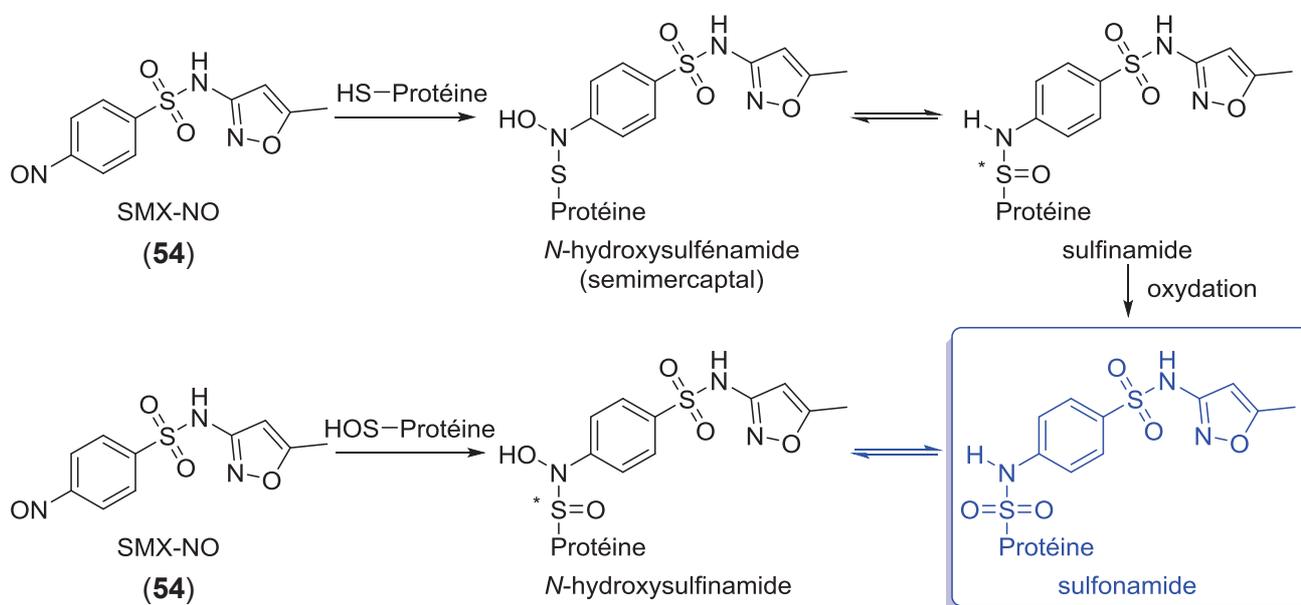


Schéma 79 : Analogie entre la réactivité du dérivé SMX-NO (54) avec une protéine-SH ou -SOH

Préparer des dérivés sulfonamides est plus simple que synthétiser des sulfinamides ou des *N*-hydroxysulfinamides, non seulement d'un point de vue synthétique, mais également pour une question de stabilité du sulfinamide d'intérêt. Par ailleurs les sulfinamides sont des composés

chiraux : la cystéine possédant déjà un centre asymétrique, la synthèse d'un monomère cystéine-SMX couplé par un lien sulfinamide conduirait à l'obtention de deux diastéréoisomères, donc à deux composés aux propriétés chimiques, et probablement biologiques, différentes. Nous avons donc choisi de synthétiser le monomère cystéine-SMX *via* la formation d'un lien sulfonamide (**173**).

Le sulfonamide (**173**) serait issu d'une déprotection de l'acide carboxylique de son analogue protégé. Pour synthétiser un sulfonamide, plusieurs techniques existent, la plus simple est de coupler le SMX (**5**) avec le chlorure de l'acide cystéique (**174**). Celui-ci serait obtenu par une oxydation/chloration réalisée sur la cystéine protégée sur sa fonction amine par un groupement Fmoc et sur sa fonction acide par un ester de R₁ (**175**), lui-même obtenu par protection de la fonction acide et déprotection de la fonction thiol à partir d'une Fmoc-cystéine commerciale, S-protégée (**176**) (Schéma 80).

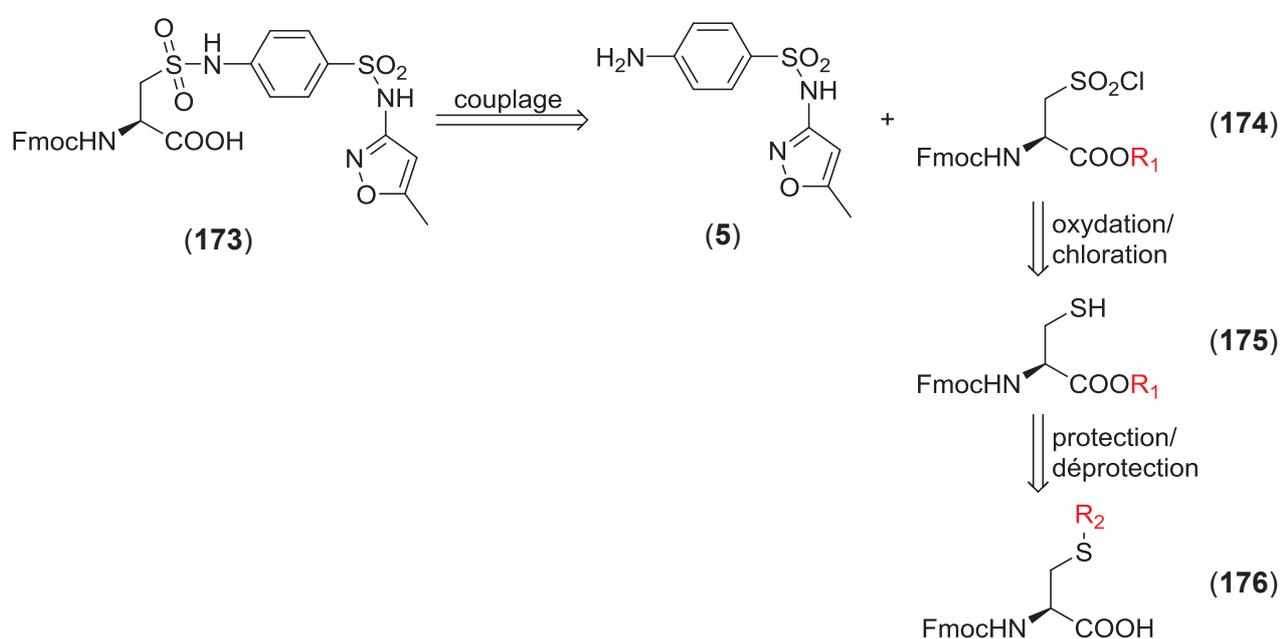


Schéma 80 : Rétrosynthèse du monomère Cys-SMX (**173**) à partir d'une cystéine commerciale N-Fmoc et S-protégée par un groupement R₂ (**176**)

En premier lieu, les groupements protecteurs de la cystéine R₁ et R₂ vont devoir être choisis de manière orthogonale.

1) Choix des groupements protecteurs

Contrairement aux pénicillines, le SMX (**5**) ne contient pas de fonction réactive autre que son amine primaire (le sulfonamide secondaire n'étant que peu réactif). Il n'a donc pas besoin d'être protégé. Par contre la cystéine sera protégée sur sa fonction amine par un groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyle, labile en milieu basique. Parmi les N-Fmoc cystéines commerciales nous avons choisi celle dont la fonction thiol est protégée par un groupement *tert*-butylthio, clivable par une

réduction avec le β -mercaptoéthanol (BME) ou la tributylphosphine (Bu_3P) : Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH (**177**).^{224,225} La fonction thiol est également déprotégeable en milieu oxydant, conduisant à la formation de dimères cystéines liés par un pont disulfure. Une étape de réduction est alors nécessaire pour obtenir le produit sous sa forme $-\text{SH}$. Les méthodes de déprotection réductives présentent l'intérêt de conduire directement au dérivé thiol. Après les succès avec les pénicillines et le groupement protecteur allyle sur la fonction acide carboxylique de la lysine, ce dernier a été préféré pour la synthèse du monomère Cys-SMX (**173**). Mais la synthèse requérant une étape d'oxydation pour accéder au chlorure de sulfonyle, une autre protection a également été considérée, le groupement *para*-méthoxybenzyle (Schéma 81).

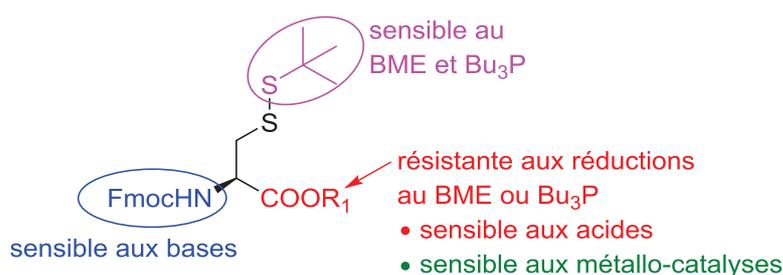
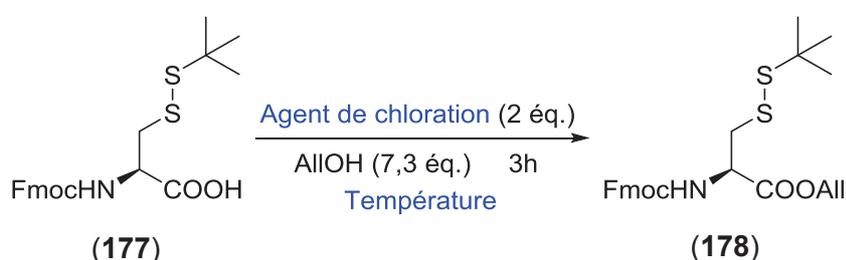


Schéma 81 : Choix des groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Cys(SMX)-OH (**173**)

a) Protection par un ester d'allyle

Pour protéger l'acide carboxylique de la cystéine commerciale (**177**) avec un groupement allyle plusieurs techniques ont été testées. Dans le Tableau 30 ci-après sont présentées deux conditions permettant d'obtenir l'ester d'allyle désiré (**178**) avec de bons rendements (Entrées 2 et 3, Tableau 30). 2 Equivalents d'un agent chlorant tels que le chlorure d'oxalyle ou de thionyle, activent l'acide carboxylique sous la forme d'un chlorure d'acyle, qui réagit alors avec l'excès d'alcool allylique, solvant de la réaction, pour former l'ester (**178**).²²⁵ Le produit de départ est cependant sensible aux températures élevées : lorsque la réaction est portée à reflux, ce dernier est entièrement dégradé (Entrée 1, Tableau 30).



Entrée	Agent de chloration	T°C	Rdt
1	SOCl_2	reflux	dégradation
2	$(\text{COCl})_2$	TA	80%
3	SOCl_2	TA	92%

Tableau 30 : Optimisation des conditions de l'estérification de l'acide carboxylique de la cystéine commerciale (**177**)

b) Protection par un ester de *para*-méthoxybenzyle

Pour la synthèse de l'ester de *para*-méthoxybenzyle (**179**), l'activation de la fonction acide carboxylique du produit de départ (**177**) a été réalisée avec la *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), comme dans le cas de la protection de la pénicilline G (**7**) selon Nahmany *et al.* (cf. Chapitre I partie III 1) a) Tableau 14 p.116).²²⁸ Le produit désiré (**179**) est bien obtenu mais avec un faible rendement : un produit secondaire (**180**) est isolé à hauteur de 22%. Ce dernier a été caractérisé et s'avère être le produit d'une addition irréversible de la DCC sur le carbonyle de l'acide carboxylique lui-même activé par la DCC.

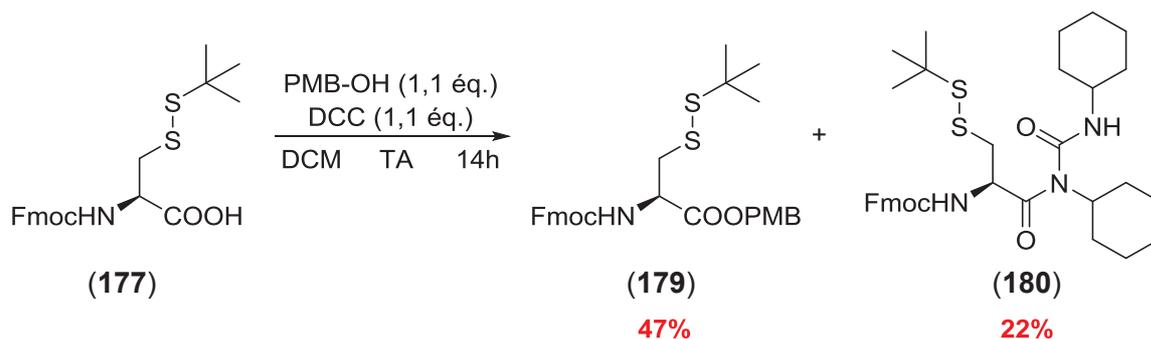


Schéma 82 : Protection de la cystéine commerciale (**177**) en ester de *para*-méthoxybenzyle(**179**) et isolation du produit secondaire (**180**)

Ce produit secondaire a également été observé par Sheikh *et al.*, qui décrivent son mécanisme d'obtention.²⁷⁵ Lorsque la base 4-diméthylaminopyridine (DMAP) n'est pas présente dans le milieu réactionnel (voies rouge et noire, Schéma 83), il est possible, de par la réactivité des amines, de rencontrer le produit secondaire (**180**), où l'amine de la DCC attaque le carbonyle activé de l'acide avant l'alcool désiré. L'ajout de la DMAP est donc nécessaire à la bonne obtention du produit désiré (**179**) (voie bleue, Schéma 83). Cette base vient attaquer le carbonyle de l'acide activé avant l'amine de la DCC, induisant la perte de la 1,3-dicyclohexylurée (DCU). Lors de l'attaque de l'alcool, son départ est favorisé (Schéma 83). La DMAP est retrouvée à la fin de la synthèse, sa présence dans le milieu peut donc être en quantité catalytique (comme usuellement employée).

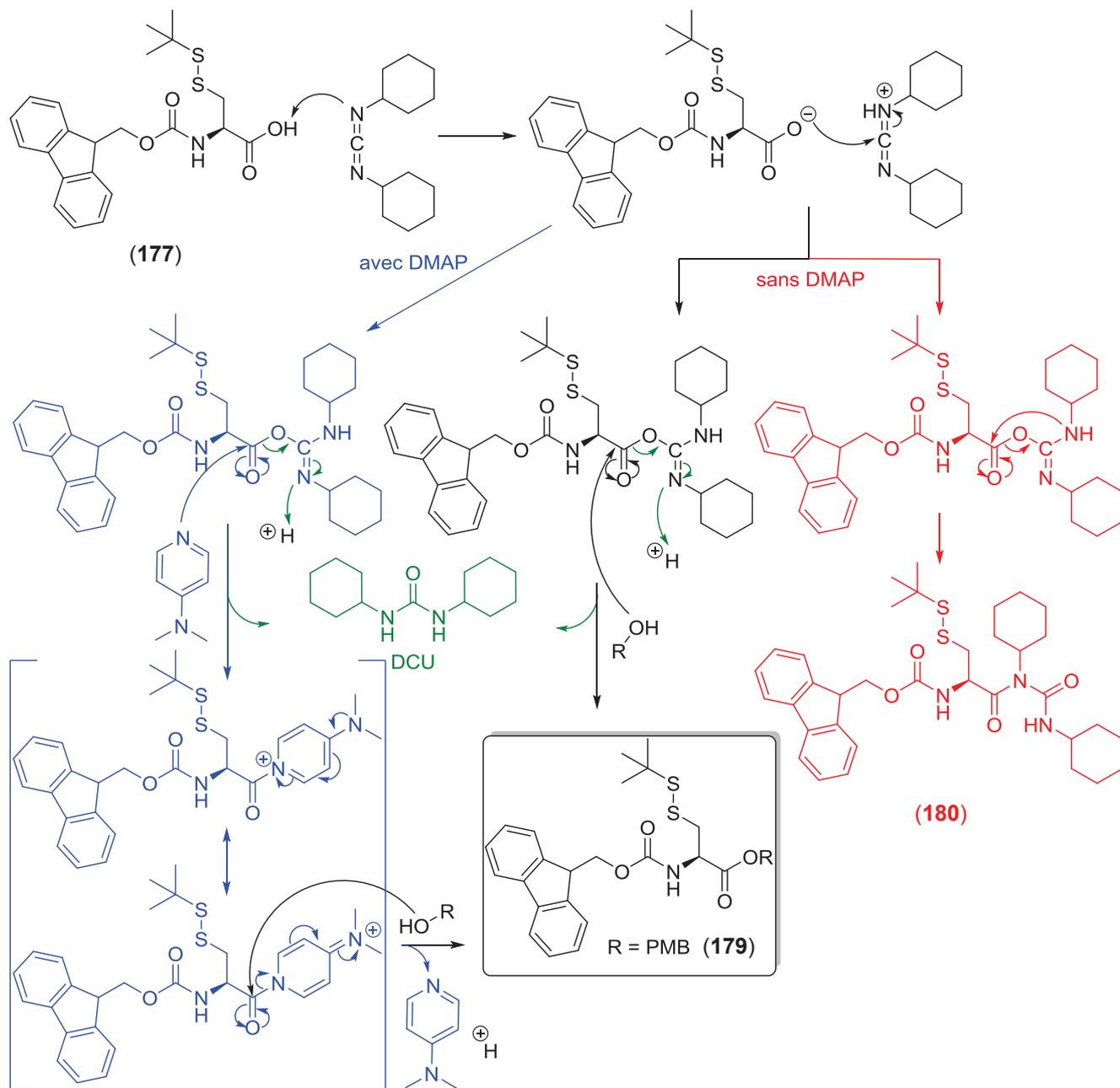


Schéma 83 : Mécanisme d'obtention du produit secondaire (180) lorsque la DMAP n'est pas présente dans le milieu (voies rouge et noire) comparé au mécanisme avec DMAP (voie bleue)

c) Clivage du groupement *tert*-butylthio

Une fois les produits protégés sous forme d'ester d'allyle (**178**) et d'ester de *para*-méthoxybenzyle (**179**), le groupement *tert*-butylthio peut être clivé. La méthode de Ramage et Stewart employant le Bu_3P dans le trifluoroéthanol a été appliquée à l'ester de *para*-méthoxybenzyle (**179**).²⁷⁶ Le produit attendu (**181**) est obtenu avec un bon rendement de 78% (Schéma 84).

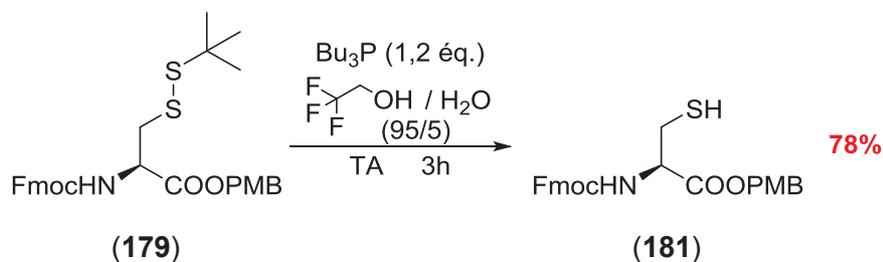


Schéma 84 : Déprotection de la fonction *tert*-butylthio sur la cystéine ester de *para*-méthoxybenzyle (179)

Bien que la conversion soit totale, la difficulté de séparation du produit (181) de l'excès de tributylphosphine et de l'oxyde de tributylphosphine généré lors de la déprotection, explique le rendement obtenu.

Les mêmes conditions appliquées à l'ester d'allyle (178) ne permettent pas d'obtenir le dérivé thiol correspondant (182).²⁷⁶ Seule l'alanine (183) est isolée, avec un rendement de 30% (Schéma 85).

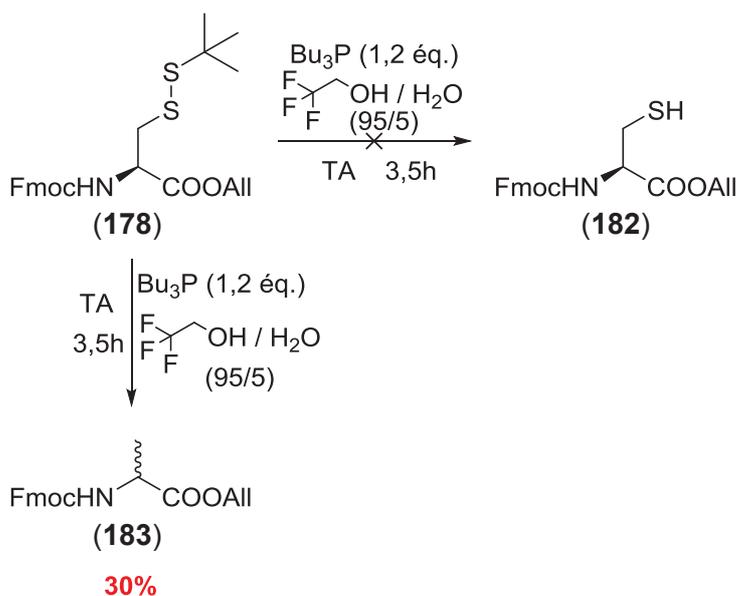


Schéma 85 : Déprotection de la fonction *tert*-butylthio par le Bu_3P menant au composé Fmoc-Ala-OAll (183)

La réduction complète en alanine lors de la déprotection du groupement *tert*-butylthio par le Bu_3P a été décrite dans la littérature.²⁷⁷ Lors de l'attaque de la phosphine sur le motif cystéine (184), l'anion *tert*-butylthiolate est généré. D'après Rijkers *et al.*, ce dernier serait capable d'engendrer une β -élimination sur le produit (185) conduisant à la formation de la tributylthiophosphine et de l'accepteur de Michael (186) (Schéma 86).²⁷⁷

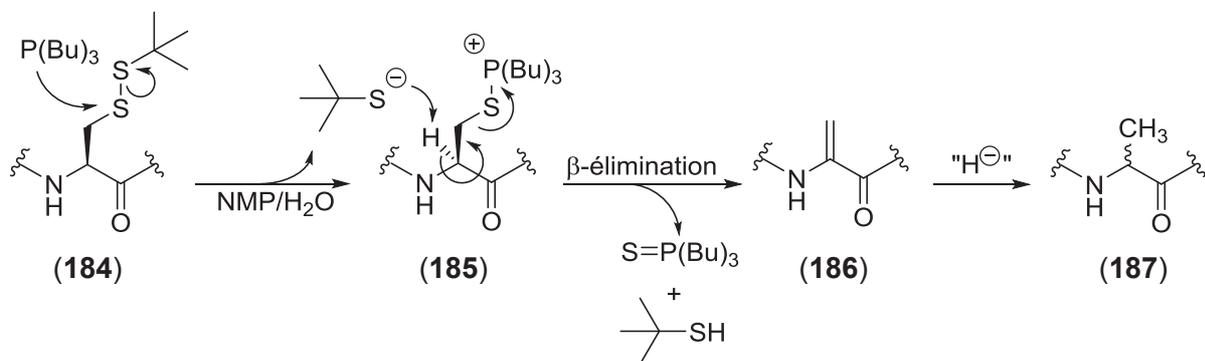


Schéma 86 : Mécanisme de déprotection du groupement *tert*-butylthio avec β-élimination de la fonction thiol d'après Rijkers *et al.*²⁷⁷

Si dans la proposition de mécanisme de Rijkers la présence d'hydrure explique la réduction de l'accepteur de Michael (**186**), cela n'est pas le cas dans nos conditions de clivage. De même les cystéines (**178**) et (**179**) ne diffèrent que par la nature de leur ester. Le fait que seul dans le cas de l'ester d'allyle (**178**), l'alanine (**183**) soit formée avec un rendement de 30% pourrait s'expliquer par l'intervention du motif allylique dans la formation d'une espèce réductrice capable de réduire le produit (**178**) en alanine (**183**).

Une autre méthode de déprotection du groupement *tert*-butylthio est donc envisagée. Postma et ses collaborateurs ont décrit la déprotection quantitative du groupement *tert*-butylthio par le β-mercaptoéthanol (BME) sur des peptides *N*-Fmoc (Schéma 87).²⁷⁸

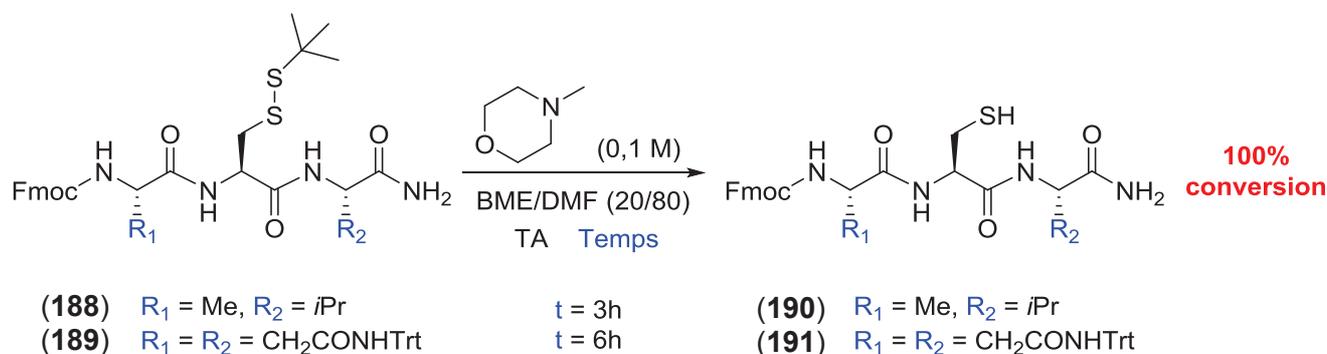


Schéma 87 : Déprotection du groupement *tert*-butylthio sur les peptides (188**) et (**189**) d'après Postma *et al.*²⁷⁸**

Les mêmes conditions appliquées à la cystéine ester d'allyle (**178**) n'ont pas permis d'accéder au produit désiré (**182**), même après 8h de réaction.

La protection de la fonction thiol par le groupement protecteur –*t*Bu est abandonnée au vu des difficultés de déprotection ou de purification des produits. Orientés par les publications de Denis et Trifilieff,²⁷⁹ et de Rijkers et ses collaborateurs,²⁷⁷ nous avons retenu le groupement 4-méthoxytrityle (Mmt), connu pour être plus facilement déprotégeable qu'un groupement trityle.²⁸⁰

Le produit commercial à partir duquel la synthèse sera réalisée est donc la Fmoc-Cys(Mmt)-OH (**192**). Sachant que le groupement protecteur 4-méthoxytrityle est labile en conditions acides, nous avons choisi de protéger la fonction acide carboxylique sous la forme d'ester d'allyle, stable aux conditions acides et basiques. Cependant, l'allyle peut s'avérer sensible aux conditions d'oxydation de la fonction thiol. Le groupement benzyle est également retenu comme protecteur de la fonction acide, son clivage se fera sous hydrogénation catalytique. Cependant, certaines publications relatent de façon contradictoire le clivage simultané du groupement Fmoc dans ces conditions d'hydrogénolyse (Schéma 88).^{224,242,281-289}

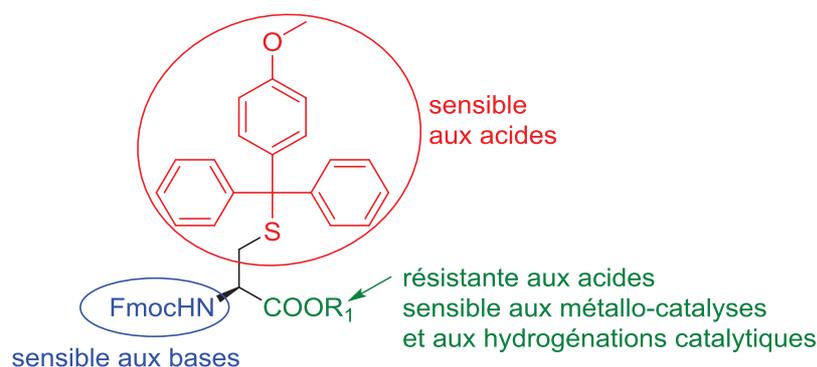


Schéma 88 : Choix des nouveaux groupements protecteurs orthogonaux pour la synthèse de la Fmoc-Cys(SMX)-OH (**173**)

2) Protection de l'acide carboxylique de la Fmoc-Cys(Mmt)-OH

a) Protection par un ester d'allyle

Pour effectuer la protection de la fonction acide carboxylique de la cystéine commerciale (**192**), la méthode classique au chlorure de thionyle dans l'alcool allylique ne peut être utilisée : la formation de HCl pourrait engendrer le clivage du groupement 4-méthoxytrityle précocement. Néanmoins, un grand nombre de méthodes permettant d'accéder au produit estérifié (**193**) avec de bons rendements sont disponibles, par exemple :

- avec un excès de bromure d'allyle et une base telle que K_2CO_3 , Cs_2CO_3 ou encore la DIEA, dans un solvant type DMF ou acétonitrile,^{257,290-292}
- avec des agents de couplage et l'alcool allylique.²⁹³

La seconde méthode est préférée : l'application des conditions de You et Kelly, permet d'obtenir l'ester d'allyle (**193**) avec un rendement quantitatif (Schéma 89).

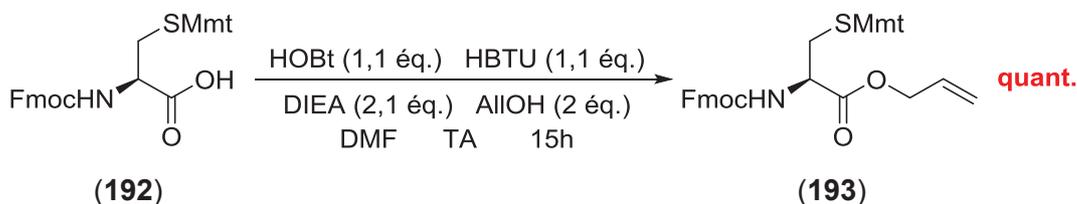


Schéma 89 : Protection de la fonction acide carboxylique de la cystéine commerciale (192) en ester d'allyle (193)

b) Protection par un ester de benzyle

La méthode avec les agents de couplage HOBt/HBTU est très efficace, mais reste onéreuse pour des synthèses sur large échelle. Une autre méthode brevetée par Takahashi utilisant le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) comme agent de couplage est réalisée.²⁹⁴ La DMAP est ajoutée, en quantité catalytique afin d'éviter la déprotection du groupement Fmoc. La cystéine ester de benzyle (**194**) est obtenue avec un rendement de 90% (Schéma 90).

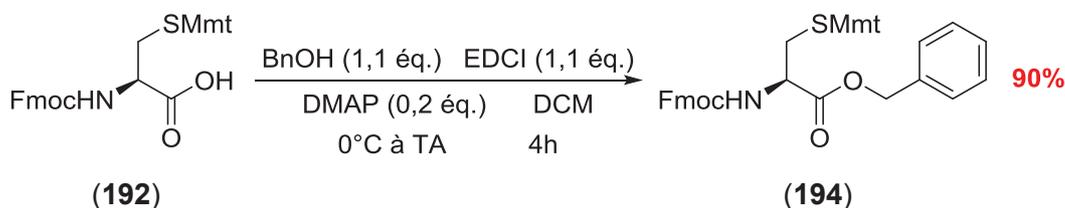


Schéma 90 : Protection de la fonction acide carboxylique de la cystéine commerciale (192) en ester de benzyle (194)

Les deux *N*-Fmoc *S*-Mmt cystéines protégées en ester d'allyle (**193**) et de benzyle (**194**) ont donc été obtenues avec de bons rendements et sont engagées dans l'étape de déprotection de la fonction thiol de son groupement 4-méthoxytrityle.

3) Clivage du groupement 4-méthoxytrityle

Le 4-méthoxytrityle est un groupement acido-labile. Son clivage requiert des conditions moins drastiques que le groupement trityle.^{225,280} En règle générale, entre 1 et 5% de TFA suffisent à déprotéger la fonction thiol du 4-méthoxytrityle, en présence d'une espèce capable de piéger le cation 4-méthoxytrityle formé.^{277,279,280,291} Cette espèce est usuellement un silane, le triisopropylsilane (TIS) ou le triéthylsilane. Un premier essai de déprotection avec 1% de TFA dans un mélange 95/5 de DCM/TIS n'a pas permis de déprotéger la fonction thiol, même après 15 heures. La quantité de TFA est alors augmentée à 2%. Les produits désirés (**182**) et (**195**) ont été isolés après 2h de réaction avec des rendements respectifs de 58% pour l'ester d'allyle (**182**) et de 92% pour l'ester de benzyle (**195**) (Schéma 91).

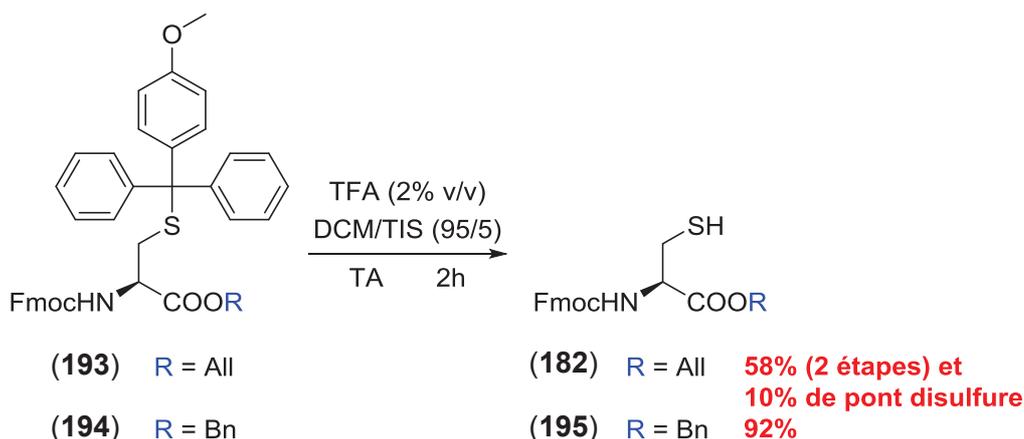


Schéma 91 : Clivage du groupement 4-méthoxytrityle sur les cystéines esters d'allyle (193) et de benzyle (194)

Malgré les précautions prises pour éviter la formation des produits (182) et (195) sous forme de pont disulfure (réaction sous argon, solvants dégazés...), le rendement obtenu pour le produit sous forme d'ester d'allyle (182) reste faible dû à l'isolement de 10% de produit sous forme de pont disulfure.

4) Oxydation/chloration du dérivé thiol en chlorure de sulfonyle

a) Etude bibliographique

Il existe de nombreuses méthodes de formation d'un chlorure de sulfonyle à partir d'un thiol. Pour ce faire, la fonction thiol doit être oxydée en acide sulfonique puis chlorée. Des procédés monotypes ou multiétapes ont été développés. Une succincte étude bibliographique a donc été réalisée en vue de choisir la méthode la plus adaptée à notre substrat.

Pour ce qui est des méthodologies en deux étapes, la première étape est l'oxydation de la fonction thiol en acide sulfonique. Des méthodes simples et efficaces existent comme par exemple celle décrite par Sureshabu *et al.*, utilisant de l'acide performique formé *in situ* (Schéma 92).²⁹⁵

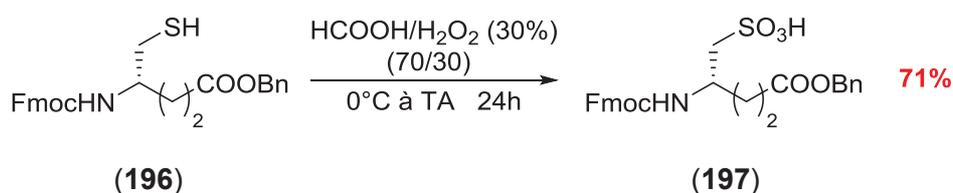


Schéma 92 : Oxydation de la fonction thiol du composé (196) en acide sulfonique (197) d'après Sureshabu et ses collaborateurs²⁹⁵

Une autre méthode décrite par Zheng et Richardson permet, par l'action du monoperoxyphthalate de magnésium (MMPP), d'oxyder la cystéine (**22**) en acide cystéique (**198**) en très peu de temps en conditions aqueuses neutres. Cette réaction aboutit à une excellente conversion et une sélectivité de 100% (Schéma 93).²⁹⁶

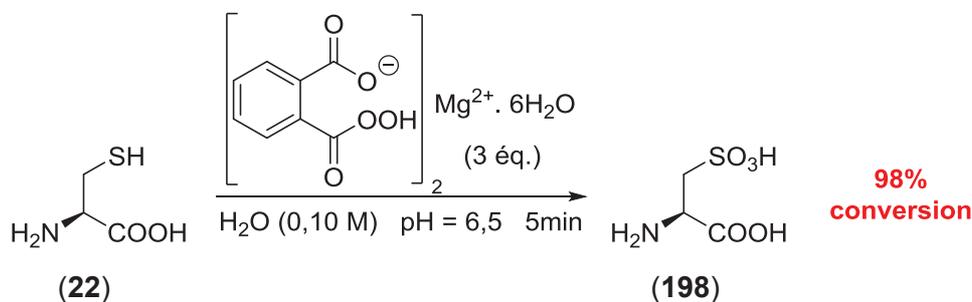
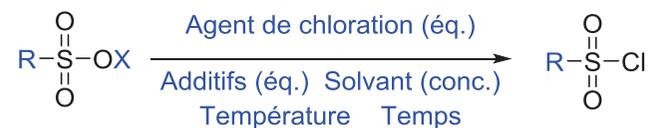


Schéma 93 : Oxydation de la cystéine (**22**) en acide cystéique (**198**) par le MMPP d'après Zheng et Richardson²⁹⁶

Une fois l'acide sulfonique obtenu la seconde étape consiste en la chloration du dérivé acide sulfonique en chlorure d'acide. Les méthodes possibles sont listées dans le Tableau 31 ci-après. Lum et ses collaborateurs réalisent la conversion du substrat (**199**) sous forme de sel de sodium dans du trichlorure de phosphoryle en guise de solvant (Entrée 1, Tableau 31).²⁹⁷ Varano *et al.* ajoutent du pentachlorure de phosphore et utilisent un substrat sous forme de sel de pyridinium (**200**) (Entrée 2, Tableau 31).²⁹⁸ Dans une publication d'Al-Riyami et ses collaborateurs, seul le pentachlorure de phosphore est utilisé dans du dichlorométhane pour permettre la conversion du sulfonate de tetrabutylammonium (**201**) en chlorure de sulfonyle (Entrée 3, Tableau 31).²⁹⁹ De même, Christensen *et al.* se placent dans du pentachlorure de phosphore, sans solvant (Entrée 4, Tableau 31).³⁰⁰ Ces agents chlorants sont des dérivés phosphorés. D'autres méthodes existent mettant en jeu des agents de chloration organiques tels que la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (TCT), utilisée par Blotny (Entrée 5, Tableau 31).³⁰¹ L'inconvénient de ces premières méthodes est l'utilisation d'un substrat sous forme de sel, obligeant pour sa formation l'utilisation d'une base qui serait capable de générer le clivage du groupement protecteur Fmoc sur l'amine de la cystéine. Les méthodes impliquant directement un acide sulfonique sous sa forme moléculaire seront donc préférées. Dans la publication de Blotny déjà évoquée, la même réaction au TCT est également engagée sur des acides sous forme -SO₃H, ainsi que dans une publication de De Luca *et al.*, sous irradiations micro-ondes (Entrées 6 et 7, Tableau 31).^{301,302} Un autre oxydant organique utilisé par Sureshbabu *et al.* est le triphosgène. Ce réactif est communément employé avec une quantité catalytique de DMF permettant de former un complexe plus efficace (Entrée 8, Tableau 31).²⁹⁵ Le dernier exemple présenté est celui de Pancheva et ses collaborateurs qui chlorent l'acide sulfonique de la cystéine protégée (**205**) à l'aide d'un léger excès de chlorure de thionyle dans du dichlorométhane (Entrée 9, Tableau 31).³⁰³



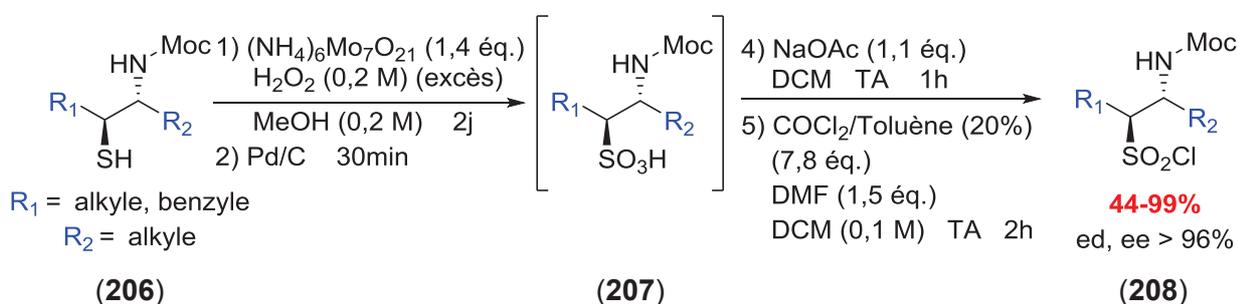
Entrée	R	X	Agent de chloration (éq.)	Additifs (éq.)	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Rdt	Référence
1		Na ⁺ (199)	POCl ₃ (excès)	-	POCl ₃	0,02 M	TA	4j	90%	Lum <i>et al.</i> ²⁹⁷
2		C ₅ H ₅ N ⁺ (200)	PCl ₅ (1,5 éq.) POCl ₃ (12 éq.)	-	POCl ₃	0,86 M	70°C	1,5h	99%	Varano <i>et al.</i> ²⁹⁸
3		Bu ₄ N ⁺ (201)	PCl ₅ (1 éq.)	-	DCM	0,22 M	-20°C à TA	30min	66%	Al-Riyami <i>et al.</i> ²⁹⁹
4		Na ⁺ (202)	PCl ₅ (3,2 éq.)	-	-	-	TA	solide à liquide	75%	Christensen <i>et al.</i> ³⁰⁰
5	alkyle et aryle	Na ⁺	TCT (1 éq.)	Et ₃ N (1 éq.) éther couronne 18-6 (0,05 éq.)	acétone	0,50 M	reflux	20h	70-96%	Blotny <i>et al.</i> ³⁰¹
6	méthyle et aryle	H	TCT (1 éq.)	Et ₃ N (1 éq.)	acétone	0,50 M	reflux	20h	64-96%	Blotny <i>et al.</i> ³⁰¹
7	alkyle et aryle	H	TCT (1 éq.)	Et ₃ N (1 éq.)	acétone	0,45 M	80°C μ-onde tube scellé	20min	78- 95% ^a	De Luca <i>et al.</i> ³⁰²
8		H (203)	triphosgène (0,7 éq.)	DMF (cat.)	DCM	0,10 M	0°C à TA	16h	78%	Sureshbabu <i>et al.</i> ²⁹⁵
		H (204)							71%	
9		H (205)	SOCl ₂ (2,2 éq.)	-	DCM	0,44 M	0°C à TA	1h	45%	Pancheva <i>et al.</i> ³⁰³

a : après couplage avec des aryl- ou alkylamines ([NaOH] à 2 M (1,2 éq.), THF à 50°C 10min)

Tableau 31 : Différentes conditions utilisées dans la littérature pour transformer un acide sulfonique en chlorure d'acide

Au vu de la bibliographie, les méthodes de conversion d'une fonction thiol en chlorure de sulfonyle en deux étapes successives présentées sont efficaces mais peu sont applicables à des substrats polyfonctionnalisés tels que les cystéines protégées (**182**) et (**195**). De plus, l'oxydation de la fonction thiol en acide sulfonique nécessite des oxydants trop puissants pour pouvoir être entreprise sur l'ester d'allyle (**182**). Aussi, seul l'ester de benzyle (**195**) sera employé.

Une autre méthode en telescoping a été décrite par Enders et Moll.³⁰⁴ L'oxydation de la fonction thiol (**206**) en acide sulfonique est réalisée par l'action d'eau oxygénée et d'un excès d'heptamolybdate d'ammonium, puis ce dernier est transformé en sulfonate de sodium, et chloré par l'action d'une solution de phosgène à 20% dans le toluène. Cette technique permet d'obtenir les chlorures de sulfonyle (**208**) diastéréo- et énantiomériquement purs, avec des rendements modestes à excellents (Schéma 94).



Sch\u00e9ma 94 : Synth\u00e8se du chlorure de sulfonyle (**208**) \u00e0 partir du d\u00e9riv\u00e9 thiol (**206**) en telescoping d'apr\u00e8s Enders et Moll³⁰⁴

La pr\u00e9paration des chlorures de sulfonyle peut \u00e9galement \u00eatre r\u00e9alis\u00e9e de fa\u00e7on monotop\u00e9. Le Tableau 32 r\u00e9sume les diff\u00e9rentes conditions d\u00e9crites dans la litt\u00e9rature. Bahrami et ses collaborateurs ont d\u00e9crit l'oxydation/chloration d'un grand nombre de substrats en pr\u00e9sence d'eau oxyg\u00e9e et de t\u00e9trachlorure de titane ou de zirconium ou encore de chlorure de thionyle.³⁰⁵⁻³⁰⁷ Les rendements obtenus sont tr\u00e8s bons et les temps de r\u00e9action tr\u00e8s courts, cependant les substrats pr\u00e9sent\u00e9s restent simples et peu fonctionnalis\u00e9s (Entr\u00e9es 1, 2 et 3, Tableau 32). Le m\u00e9canisme impliqu\u00e9 est le m\u00eame quel que soit le r\u00e9actif de chloration pr\u00e9sent (Sch\u00e9ma 95). Ce dernier r\u00e9agit avec un \u00e9quivalent d'eau oxyg\u00e9e pour former un d\u00e9riv\u00e9 peroxyd\u00e9 plus r\u00e9actif, qui permettra l'oxydation du thiol (**209**) en pont disulfure (**210**). L'acide hypochloreux form\u00e9 au cours de cette premi\u00e8re \u00e9tape r\u00e9agit avec le disulfure (**210**) pour l'oxyder en monoxyde de disulfure (**211**), puis en dioxyde de disulfure (**212**), qui s'hydrolyse pour donner le chlorure de sulfonyle d\u00e9sir\u00e9 (**213**).

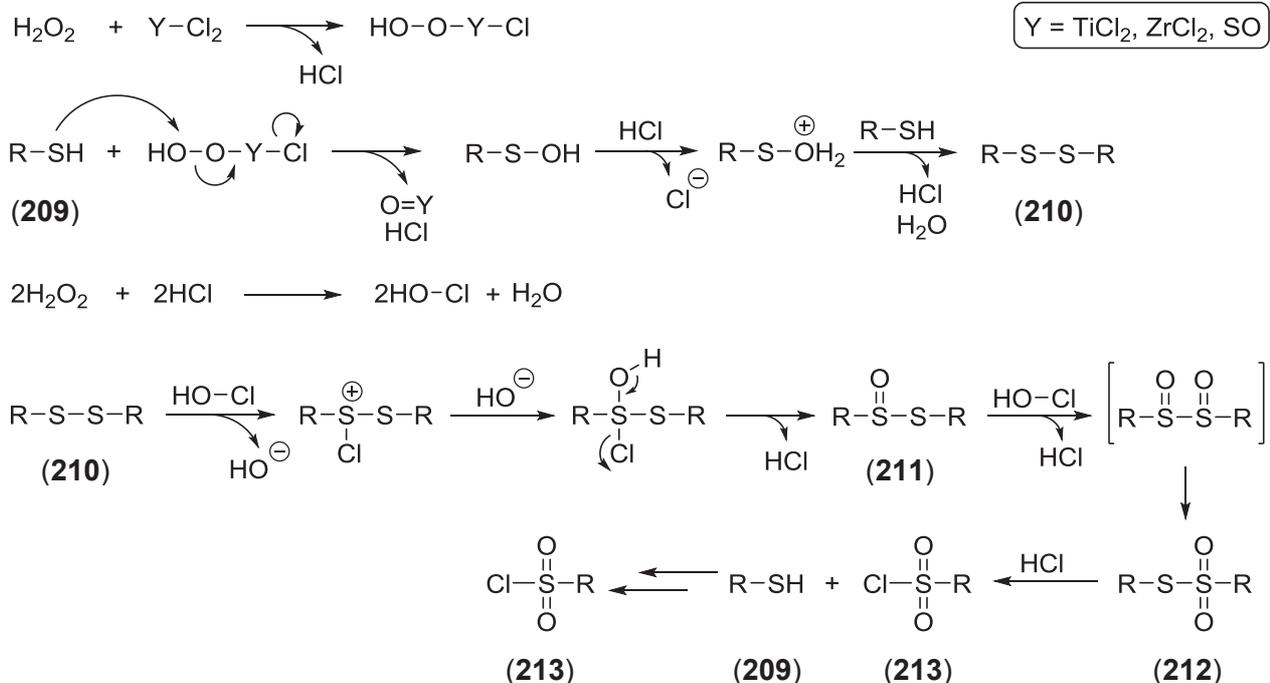


Schéma 95 : Mécanisme d'oxydation/chloration en présence d'eau oxygénée et d'Y-Cl₂ (Y = TiCl₂, ZrCl₂ ou SO) d'après Bahrami *et al.*³⁰⁵⁻³⁰⁷

Prakash *et al.*, Park *et al.*, ainsi que Churcher et ses collaborateurs rapportent l'utilisation de sels de nitrate en mélange avec un agent de chloration en vue de l'oxydation d'aryl ou d'alkylthiol simples et peu fonctionnalisés (Entrées 4, 5 et 6, Tableau 32).³⁰⁸⁻³¹⁰ Le mécanisme met en jeu le composé thiol (209) et son pont disulfure (210) dans la formation du chlorure de sulfényle (214) par l'action du chlorure de sulfuryle. Le chlorure de sulfényle (214) réagit avec le nitrate de potassium pour s'oxyder et permettre la libération de radicaux dioxyde d'azote et d'espèces RSO[•] qui se rencontrent et se réarrangent en dioxyde disulfure (212). L'action du chlorure de sulfuryle permet sa dissociation en chlorure de sulfonyle (213) et en chlorure de sulfényle (214) (Schéma 96). Il subsiste cependant des doutes sur le mécanisme précis de ces oxydations/chlorations.

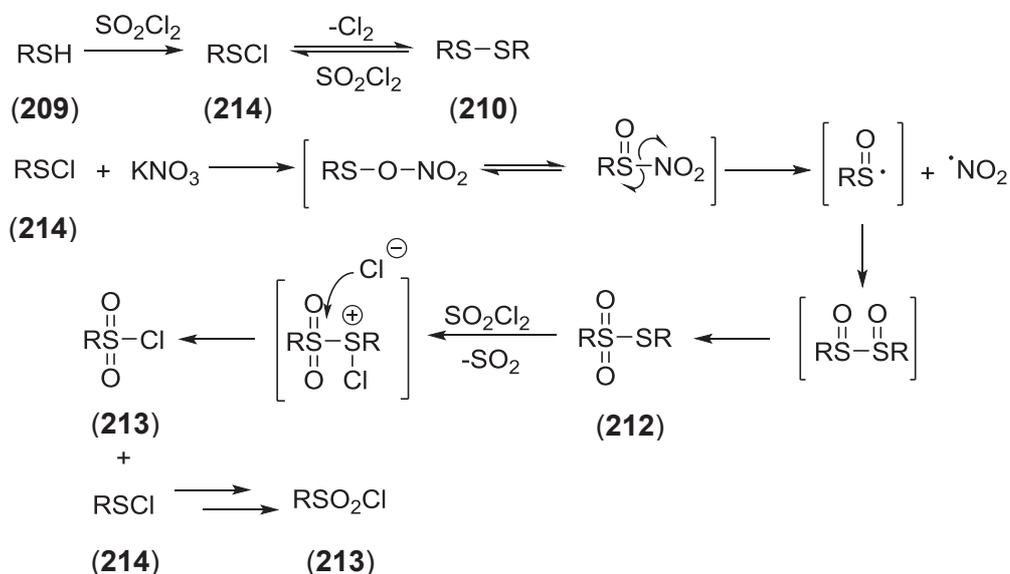
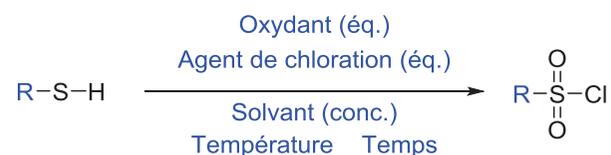


Schéma 96 : Mécanisme d'oxydation/chloration en présence de KNO_3 et de SO_2Cl_2 présenté par Park *et al.*³⁰⁹

Dans le brevet de Churcher *et al.*, deux autres méthodes sont employées pour l'oxydation/chloration des dérivés thiols. Une méthode employant de l'eau de Javel en milieu acide sulfurique, ainsi qu'une méthode employant du dichlore gazeux en milieu aqueux (Entrées 7 et 8, Tableau 32).³¹⁰ L'oxydation au dichlore gazeux est une méthode efficace, décrite également par Meinzer et ses collaborateurs sur des β -aminoalkylthiols (Entrée 9, Tableau 32).³¹¹ Une autre méthode décrite par Madabhushi *et al.* s'effectue dans l'eau, en utilisant de l'Oxone® comme oxydant (Entrée 10, Tableau 32).³¹² Cet oxydant, utilisé avec du KCl, permet de générer de l'acide hypochloreux. Cette méthode permet d'obtenir de bons rendements sur des dérivés aromatiques. Un seul exemple est décrit en série alcane sur l'hexanethiol (**218**) avec des rendements beaucoup moins bons. L'utilisation d'oxydants organiques doux, tels que le *N*-chlorosuccinimide (NCS), ou le 2,4-dichloro-5,5-diméthylhydantoïne (DCDMH), est également décrite par Nishiguchi *et al.*, et Pu *et al.* respectivement (Entrées 11 et 12, Tableau 32).^{313,314} Cependant ces techniques sont peu efficaces sur des dérivés aliphatiques.



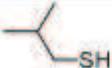
Entrée	R	Oxydant (éq.)	Agent de chloration (éq.)	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Rdt	Référence
1	alkyle, aryle	H ₂ O ₂ à 30% (3 éq.)	TiCl ₄ (1 éq.)	ACN	0,4 M	TA	1-7min	85-97%	Bahrami <i>et al.</i> ³⁰⁵
2	alkyle, aryle, hétéroaryle	H ₂ O ₂ à 30% (3 éq.)	ZrCl ₄ (1 éq.)	ACN	0,2 M	TA	1-3min	95-99%	Bahrami <i>et al.</i> ³⁰⁶
3	alkyle, aryle	H ₂ O ₂ à 30% (3 éq.)	SO ₂ Cl ₂ (1 éq.)	ACN	N.C.	TA	1min	96-99%	Bahrami <i>et al.</i> ³⁰⁷
4	alkyle, aryle	KNO ₃ (2,2 éq.)	Me ₃ SiCl (2,2 éq.)	DCM	0,2 M	50°C	1-3h	80-95%	Prakash <i>et al.</i> ³⁰⁸
5	alkyle, aryle	KNO ₃ (2,5 éq.)	SO ₂ Cl ₂ (2,5 éq.)	ACN	0,1 M	0°C	0,3-2h	68-100%	Park <i>et al.</i> ³⁰⁹
6	 (215)	KNO ₃ (2,5 éq.)	SO ₂ Cl ₂ (2,5 éq.)	ACN	0,1 M	0°C	3h	95%	Churcher <i>et al.</i> ³¹⁰
7	 (216)	Javel/H ₂ SO ₄ (conc.) (70/30)	NaOCl (aq.) (1,6 M) (10 éq.)	-	0,1 M	0°C	30min	23%	Churcher <i>et al.</i> ³¹⁰
8	 (217)	-	Cl ₂ (g) (excès)	HCl (2 N)	0,5 M	0°C	15min	37%	Churcher <i>et al.</i> ³¹⁰
9	β-aminoalkylthiol	-	Cl ₂ (g) (excès)	EtOH/HCl (sat. dans CCl ₄)	0,1 M	10°C	N.C.	65-77%	Meinzer <i>et al.</i> ³¹¹
10	aryle	Oxone® (2,5 éq.)	KCl (1 éq.)	H ₂ O	0,3 M	TA à 45°C	10-20min	88-95%	Madabhusi <i>et al.</i> ³¹²
	hexyle (218)						12min	68%	
11	-Ph (219)	-	NCS (4 éq.)	ACN/HCl (2 N) (5/1)	0,6 M	10-20°C	10-30min	81%	Nishiguchi <i>et al.</i> ³¹³
	-Et (220)							56%	
12	aryle, hétéroaryle	-	DCDMH (1,5 éq.)	ACN/AcOH /H ₂ O	0,1 M	0°C à TA	1h	85-100%	Pu <i>et al.</i> ³¹⁴

Tableau 32 : Différentes conditions utilisées dans la littérature pour transformer un thiol en chlorure d'acide

Une méthode publiée en 2013 par Joyard et ses collaborateurs a été appliquée au substrat (**221**), proche de la cystéine *N*-Fmoc ester de benzyle (**195**) (Schéma 97).³¹⁵ L'oxydant et l'agent de chloration utilisé est l'hypochlorite de *tert*-butyle, facilement et rapidement préparable par la méthode de Mintz et Walling à partir de *tert*-butanol et d'eau de Javel.³¹⁶ Par cette méthode, la cystéine protégée (**221**) est convertie en sulfonamide (**223**) en quatre étapes réalisées séquentiellement en monotope (déprotection, oxydation, chloration puis amidation) avec un bon rendement.

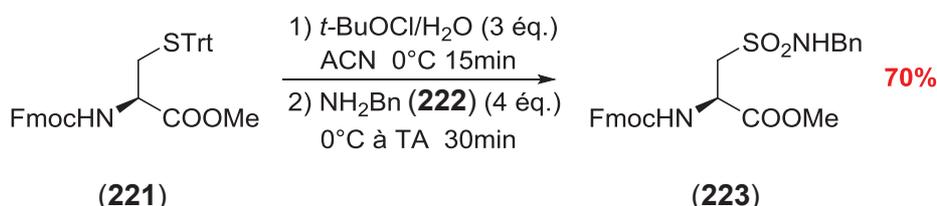


Schéma 97 : Oxydation de Joyard *et al.* sur la Fmoc-Cys(Trt)-OMe (**221**) avec du *t*-BuOCl³¹⁵

Après cette étude bibliographique, les oxydations/chlorations en une seule étape ou en monotope seront préférées aux méthodes impliquant deux étapes successives ou séquentielles. De même, les méthodes peu efficaces sur des substrats aliphatiques seront écartées. Les méthodes impliquant le dichlore gazeux bien qu'efficaces n'ont pas été considérées de par la complexité de la manipulation d'un tel gaz. Les méthodes mettant en jeu l'eau oxygénée, le chlorure de sulfuryle ou les hypochlorites de soude ou de *tert*-butyle ne seront pas applicables à notre cystéine (**182**) contenant le groupement allyle.

b) Essai d'oxydation/chloration sur l'ester d'allyle de cystéine

Malgré le domaine étroit d'application des méthodes d'oxydations/chlorations trouvées dans la littérature, une tentative d'oxydation à tout de même été réalisée sur le dérivé ester d'allyle (**182**), avec NH_4NO_3 comme oxydant et du TMSCl comme agent de chloration, suivant la méthode décrite par Prakash *et al.*³⁰⁸ Cependant, aucune réaction n'a lieu et le produit de départ (**182**) est récupéré inchangé (Schéma 98).

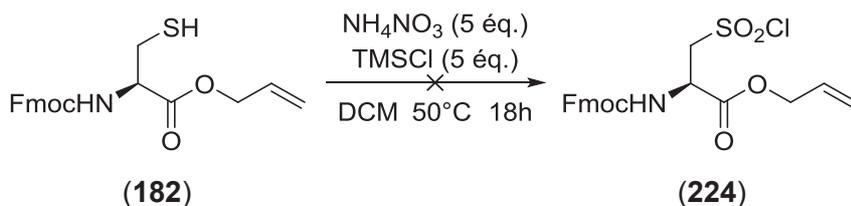
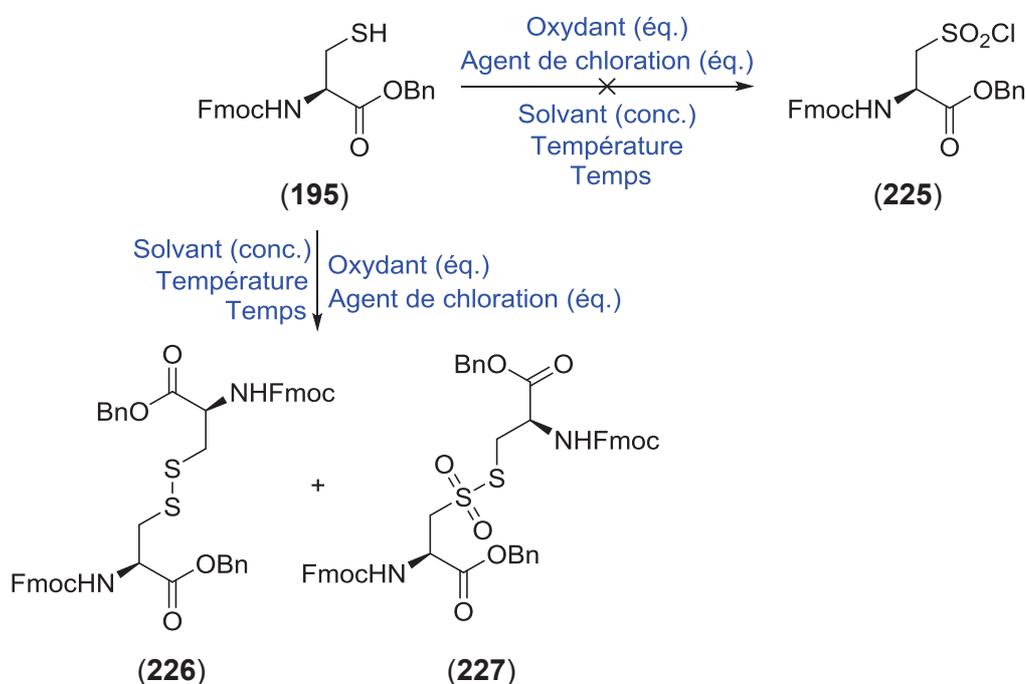


Schéma 98 : Tentative d'oxydation/chloration de la cystéine ester d'allyle (**182**) en chlorure de sulfonyle (**224**)

La seule méthode facilement applicable à la cystéine (**182**) n'ayant pas porté ses fruits, les limites dues à la possible oxydation de la fonction allyle nous ont finalement contraint à continuer les essais sur le dérivé cystéine protégée par un ester de benzyle (**195**).

c) Oxydation/chloration sur l'ester de benzyle de cystéine

Différents essais d'oxydation/chloration ont été réalisés et les résultats sont résumés dans le Tableau 33. Les modes opératoires décrits par Bahrami *et al.* (Entrée 1, Tableau 33),³⁰⁷ Park *et al.* (Entrée 2, Tableau 33),³⁰⁹ Churcher *et al.* (Entrées 2 et 3, Tableau 33)³¹⁰ et Madabhushi *et al.* (Entrée 4, Tableau 33)³¹² ont été appliqués au substrat (**195**) mais le chlorure de sulfonyle désiré (**225**) n'est observable qu'à l'état de trace par LC-MS, les produits majoritaires étant le pont disulfure (**226**), ainsi que le pont disulfure dioxydé (**227**).



Entrée	Oxydant (éq.)	Agent de chloration (éq.)	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Commentaire
1	H ₂ O ₂ (30%) (3 éq.)	SOCl ₂ (3 éq.)	ACN	0,10 M	TA	5h	(226) et (227) majoritaires
2	KNO ₃ (2,5 éq.)	SO ₂ Cl ₂ (2,5 éq.)	ACN	0,10 M	0°C	15h	(226) et (227) majoritaires
3	Javel/H ₂ SO ₄ (conc.) (70/30)	NaOCl (aq.) (0,9 M) (10 éq)	-	0,06 M	0°C à TA	15h	(226) et (227) majoritaires
4	Oxone® (2,5 éq.)	KCl (1 éq.)	H ₂ O/ACN	0,30 M	TA à 40°C	4h	(226) et (227) majoritaires

Tableau 33 : Différentes conditions entreprises pour convertir la fonction thiol du composé (**195**) en chlorure de sulfonyle (**225**)

En raison de ces résultats décevants, la réaction est ensuite tentée en deux étapes successives d'après le mode opératoire de Sureshabu *et al.*²⁹⁵ L'oxydation de la fonction thiol de la cystéine (**195**) est réalisée à l'aide de l'acide performique formé *in situ*. L'acide sulfonique (**228**) n'a pas été isolé ni caractérisé et est engagé directement dans la seconde étape de chloration au triphosgène, mais aucun produit n'est récupéré après cette dernière (Schéma 99).

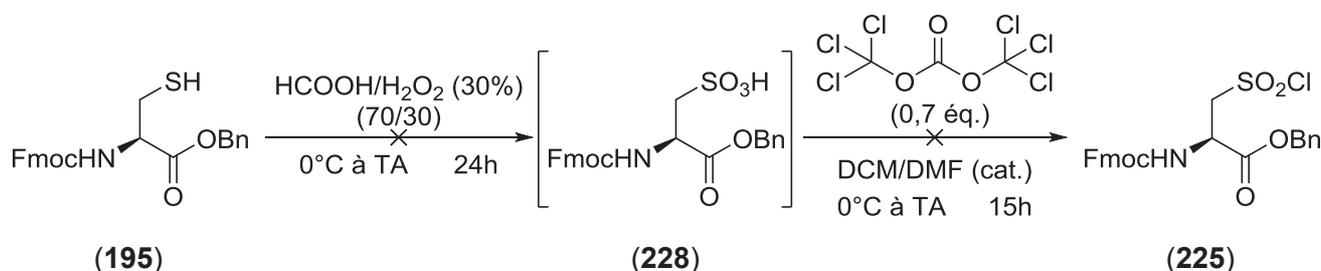


Schéma 99 : Tentative d'oxydation puis de chloration du composé (**195**) en deux étapes

Le mode opératoire récemment décrit par Joyard *et al.* sur le dérivé cystéine (**221**) laisse donc plus d'espoir quant au succès de la synthèse en raison de sa forte ressemblance avec la cystéine (**195**).³¹⁵ Dans un premier temps, la synthèse de l'hypochlorite de *tert*-butyle est réalisée. Ce composé est synthétisé à partir du *tert*-butanol avec un bon rendement, suivant le mode opératoire décrit par Mintz et Walling (Schéma 100).³¹⁶

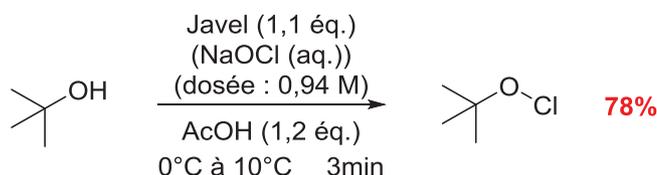
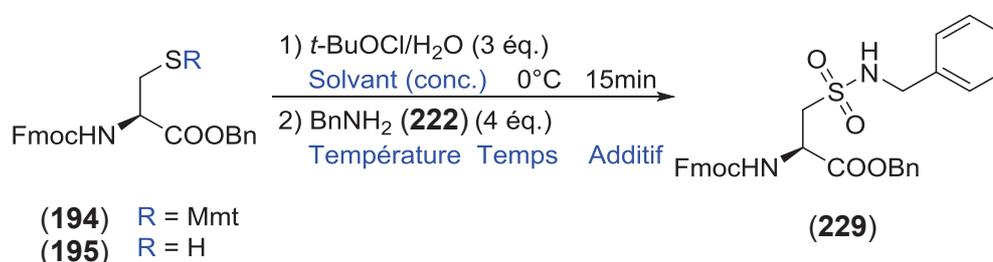


Schéma 100 : Synthèse de l'hypochlorite de *tert*-butyle à partir de l'alcool *tert*-butyle

Pour éviter l'introduction d'un excès de réactif, l'hypochlorite de *tert*-butyle est dosé. Sa concentration varie de 7,5 à 8 M suivant les lots synthétisés. Pour reproduire au plus près les conditions décrites par Joyard et ses collaborateurs, la réaction est dans un premier lieu réalisée en présence de benzylamine (**222**) afin de piéger le chlorure de sulfonyle généré en sulfonamide (Tableau 34).³¹⁵ Un premier test est réalisé à partir de la cystéine S-Mmt (**194**). Moins de 30% de produit (**229**) est obtenu (Entrée 1, Tableau 34). Les mêmes conditions appliquées à la cystéine sous forme thiol libre (**195**), conduisent au produit (**229**) avec 40% de rendement (Entrée 2, Tableau 34). L'étape de déprotection du groupement 4-méthoxytrityle étant rapide et efficace, les essais suivants seront réalisés à partir de la cystéine -SH (**195**). Nous avons alors tenté d'optimiser les conditions au départ de cette dernière. En premier lieu, l'eau introduite dans le milieu réactionnel pourrait participer à l'hydrolyse du chlorure

de sulfonyle (**225**) limitant l'étape d'amidation. Aussi, à la fin de l'étape d'oxydation/chloration, du MgSO_4 est introduit dans le milieu réactionnel, qui est alors filtré, concentré, puis repris dans le solvant anhydre. La benzylamine (**222**) est alors ajoutée, puis le mélange réactionnel est placé aux ultrasons pour tenter d'améliorer la cinétique de la réaction, seulement la température de la cuve monte rapidement à 40°C . Que la réaction dure 30 minutes ou 3 jours, seule la dégradation du réactif est observée *in fine* (Entrées 3 et 4, Tableau 34). Le changement de solvant par du DMSO pour l'étape d'amidation, n'a également conduit qu'à de la dégradation (Entrée 5, Tableau 34). Face à ces essais infructueux, le protocole est modifié, et la réaction est maintenue dans l'acétonitrile et à l'issue de l'étape d'oxydation/chloration, du tamis moléculaire (TM) est ajouté. Une activation aux ultrasons après l'addition de l'amine conduit à la dégradation des réactifs (Entrée 6, Tableau 34). En l'absence d'ultrasons, le produit désiré (**229**) est obtenu avec un rendement de 53% (Entrée 7, Tableau 34). L'effet favorable du tamis moléculaire est validé en effectuant la même manipulation en son absence. Le rendement obtenu est, cette fois, beaucoup plus faible (Entrée 8, Tableau 34).



Entrée	R	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Additif	Rdt
1	Mmt	ACN	0,2 M	0°C à TA	30min	-	<30%
2	H	ACN	0,6 M	0°C à TA	30min	-	40%
3	H	ACN puis ACN	0,4 M	0 puis 40°C	30min	$\text{MgSO}_4 + \dots$)	dégradation
4	H	ACN puis ACN	0,4 M	0 puis 40°C	3j	$\text{MgSO}_4 + \dots$)	dégradation
5	H	ACN puis DMSO	0,4 M	0 puis 40°C	2h	$\text{MgSO}_4 + \dots$)	dégradation
6	H	ACN	0,8 M	0 à 40°C	1h	TM 3Å + \dots)	dégradation
7	H	ACN	0,3 M	0°C à TA	2h	TM 3Å	53%
8	H	ACN	0,3 M	0°C à TA	2h	-	27%

Tableau 34 : Optimisation de la synthèse de la cystéine benzylaminosulfonyle (**229**) à partir des cystéines (**194**) ou (**195**)

Après une optimisation des conditions de Joyard *et al.*, le sulfonamide est obtenu avec 53% sur trois étapes d'oxydation/chloration/amidation. Sachant que Joyard *et al.* décrivent cette séquence avec un rendement de 70%, nous avons tenté de reproduire leur synthèse.

d) Reproduction du mode opératoire de la publication de Joyard *et al.*

Dans un premier lieu, la cystéine *N*-Fmoc-S-Mmt ester de méthyle (**230**) est synthétisée avec un rendement de 86% en présence de l'agent de couplage EDCI (Schéma 101).

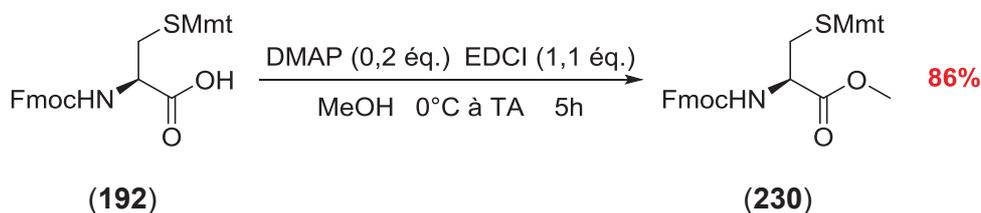


Schéma 101 : Synthèse de la cystéine *N*-Fmoc-S-Mmt ester de méthyle (**230**)

Au départ du produit (**230**), la séquence oxydation/chloration/amidation est reproduite selon le mode opératoire de Joyard *et al.* Au bout de 30 minutes après l'addition de l'amine, un contrôle CCM indique toujours la présence du produit de départ. La réaction n'est totale qu'au bout de 15h, et le produit désiré (**223**) n'est isolé qu'avec un rendement de 36%, contre 70% attendus.

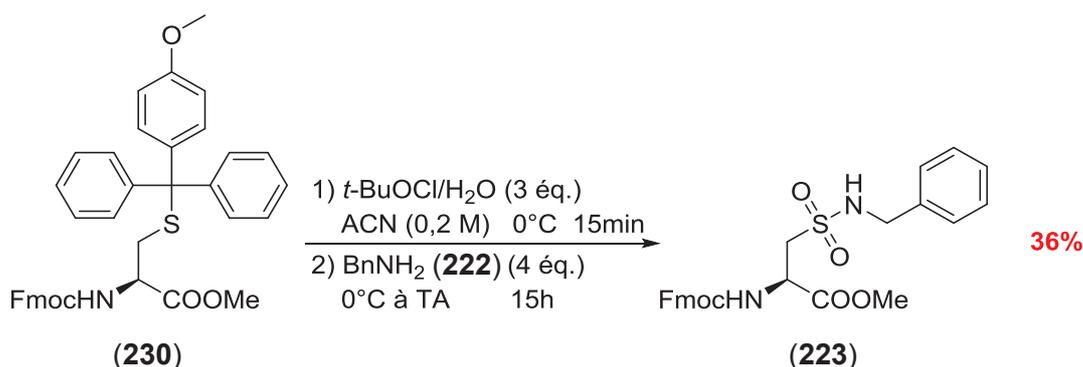


Schéma 102 : Synthèse de la cystéine benzylaminosulfonyle (**223**) en suivant le mode opératoire décrit par Joyard *et al.*³¹⁵

En conclusion, le principal facteur influençant la réaction est le *t*-BuOCl. Ce dernier est obtenu avec des puretés différentes selon les lots, et en fonction du titre de l'eau de Javel utilisée. C'est donc probablement sur ce réactif que se joue l'efficacité de cette réaction. Bien que nous n'ayons pas réussi à optimiser davantage cette séquence, les essais de couplage entre la cystéine *N*-Fmoc ester de benzyle (**195**) et le SMX (**5**) ont été entrepris.

e) Tests sur la réactivité du sulfaméthoxazole

Les quelques essais de couplage entre la cystéine *N*-Fmoc ester de benzyle (**195**) et le SMX (**5**) ont montré, par des analyses CCM, ainsi que des LC-MS que le SMX (**5**) ne réagit pas avec le chlorure de sulfonyle (**225**). Quelles que soient les conditions testées et résumées dans le Tableau

35, aucune n'a permis d'obtenir le produit souhaité (**231**). Deux bases suffisamment faibles pour ne pas cliver le groupement Fmoc ont été employées : la pyridine et la diméthylaniline (DMA), soit comme solvant, soit en quantité stœchiométrique. Pour apprécier la consommation du SMX (**5**) ce dernier est même introduit en défaut, en présence de tamis moléculaire. De même, un essai est réalisé sans la présence d'eau (Entrées 3 et 4, Tableau 35). Mais aucune de ces conditions n'a permis d'ajouter le SMX (**5**) au chlorure de sulfonyle (**225**). Le manque de réactivité du SMX (**5**) est donc mis en cause, étant donné la présence de la fonction amine primaire en position *para*- d'un groupement attracteur sulfonamide.

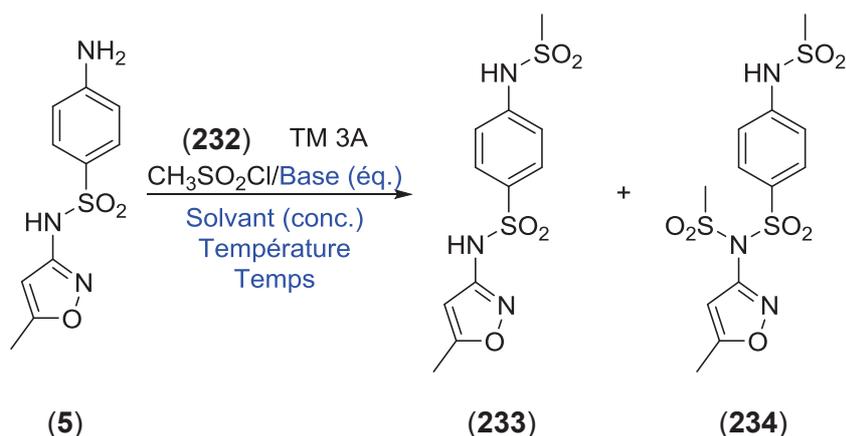


Entrée	Eq. SMX	Base (éq.)	Conc.	Temps	Additif
1	3 éq.	pyridine (excès)	0,3 M	1h	-
2	1 éq.	DMA (1,1 éq.)	0,2 M	15h	-
3	0,9 éq.	DMA (1,1 éq.)	0,2 M	15h	TM 3Å
4	0,9 éq.	DMA (1,1 éq.)	0,2 M	15h	sans eau

Tableau 35 : Différentes conditions entreprises pour tenter de synthétiser le composé (**231**)

Afin de tester la réactivité du SMX (**5**) et d'optimiser les conditions de sulfonamidation, nous avons étudié la réaction modèle de méthylation du SMX (**5**). Dans le Tableau 36 ci-après, sont présentées les différentes conditions étudiées. En l'absence de base et en présence d'une quantité catalytique de DMF, l'addition d'un défaut de chlorure de mésyle (**232**) conduit au produit mono-mésylé (**233**) avec 24% de conversion (Entrée 1, Tableau 36). L'ajout de la diméthylaniline (DMA) permet d'obtenir le produit souhaité (**233**) avec 30% de conversion en présence d'une quantité stœchiométrique de chlorure de mésyle (**232**) (Entrée 2, Tableau 36). En absence de DMF, et avec un excès de chlorure de mésyle (**232**), la conversion est nettement améliorée jusqu'à 66% (Entrée 3, Tableau 36). Une augmentation de la température à 30°C, permet également d'améliorer la conversion jusqu'à 82%. Néanmoins, deux espèces sont isolées : une grande majorité de produit mono-mésylé (**233**) et minoritairement le produit di-mésylé au niveau du sulfonamide secondaire (**234**) (Entrée 4, Tableau 36). L'utilisation de la pyridine comme base permet d'augmenter la conversion à 100%, mais la quantité de composé di-mésylé (**234**) obtenu est supérieure (Entrée 5, Tableau 36). Les conditions sont alors optimisées de manière à améliorer la proportion de produit mono-mésylé (**233**). Diminuer la quantité de chlorure de mésyle (**232**) introduite ne fait que de diminuer le taux de conversion (Entrées 6, 7 et 8, Tableau 36). Pour éviter une réaction trop rapide et favoriser la formation du composé mono-mésylé (**233**), la température de la réaction est diminuée et le temps de la réaction allongé

(Entrées 9 et 10, Tableau 36). Au minimum, 10% de produit di-mésylé (**234**) sont isolés. La concentration de la réaction est également augmentée dans les conditions pour lesquelles la conversion du SMX (**5**) n'était pas totale. La température est laissée à l'ambiante pour éviter la formation du composé di-mésylé (**234**), la réaction est contrôlée par CCM et laissée 5 jours pour augmenter au maximum la consommation de SMX (**5**) (Entrées 11, 12 et 13, Tableau 36). Au final, le taux de conversion du SMX a pu être augmenté tandis que la quantité de produit di-mésylé reste constante.



Entrée	Eq. (232)/Base	Base	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Conv. ^a	Rdt (233)/(234)
1	0,5 éq.	-	ACN/ DMF(cat.)	0,13 M	0°C à TA	15h	24%	ratio ^b : 100/0
2	1 éq.	DMA	ACN/ DMF(cat.)	0,13 M	0°C à TA	15h	30%	ratio ^b : 100/0
3	3 éq.	DMA	ACN	0,13 M	0°C à TA	15h	66%	ratio ^b : 100/0
4	3 éq.	DMA	ACN	0,13 M	0 à 30°C	15h	82%	57% / 4% ratio ^b : 98/2
5	3 éq.	pyridine	ACN	0,13 M	0 à 30°C	15h	100%	68% / 19% ratio ^b : 73/27
6	2 éq.	pyridine	ACN	0,13 M	0 à 30°C	15h	98%	79% / 6% ratio ^b : 93/7
7	1,5 éq.	pyridine	ACN	0,13 M	0 à 30°C	15h	87%	ratio ^b : 98/2
8	1 éq.	pyridine	ACN	0,13 M	0 à 30°C	15h	52%	ratio ^b : 99/1
9	3 éq.	pyridine	ACN	0,13 M	0°C à TA	24h	100%	88% / 10% ratio ^b : 89/11
10	3 éq.	pyridine	ACN	0,13 M	0°C	24h	100%	81% / 10% ratio ^b : 90/10
11	2 éq.	pyridine	ACN	0,20 M	0°C à TA	5j	100%	ratio ^b : 95/5
12	1,5 éq.	pyridine	ACN	0,30 M	0°C à TA	5j	98%	ratio ^b : 98/2
13	1 éq.	pyridine	ACN	0,40 M	0°C à TA	5j	80%	ratio ^b : 99/1

a : pourcentage de conversion calculé à partir des intégrations RMN ¹H sur le mélange brut.

b : ratio calculé à partir des intégrations RMN ¹H sur le mélange brut.

Tableau 36 : Optimisation de la réaction entre le sulfaméthoxazole (**5**) et le chlorure de mésyle (**232**)

La réactivité du SMX (**5**) ayant été investiguée au cours de cette étude par le biais du chlorure de mésyle (**232**), la réactivité de la cystéine ester de benzyle (**195**) reste donc à tester. Pour ce faire, cette dernière sera dans un premier lieu mise en condition avec des amines désactivées que sont les anilines.

f) Tests de l'oxydation de Joyard *et al.* avec des substrats proches du SMX

La cystéine *N*-Fmoc ester de benzyle (**195**) est transformée en chlorure de sulfonyle (**225**) selon les conditions de Joyard *et al.* optimisées.³¹⁵ La formation du sulfonamide est alors réalisée avec l'aniline (**235**). Le produit (**236**) est obtenu avec un rendement de 75% mais après une analyse LC-MS, il ne s'avère pur qu'à 60%. Ce dernier est en mélange avec d'autres espèces, détectées avec une masse incrémentée de 34 g/mol, ce qui correspond au même produit mais avec l'addition d'un chlore. De plus le signal de leur pic de masse présente la caractéristique isotopique des chlores avec 75% de l'espèce ³⁵Cl et 25% de ³⁷Cl, ce qui laisse penser qu'une addition de chlore électrophile (généralisé par l'hypochlorite de *tert*-butyle) sur un des cycles aromatiques présents sur la molécule a lieu.

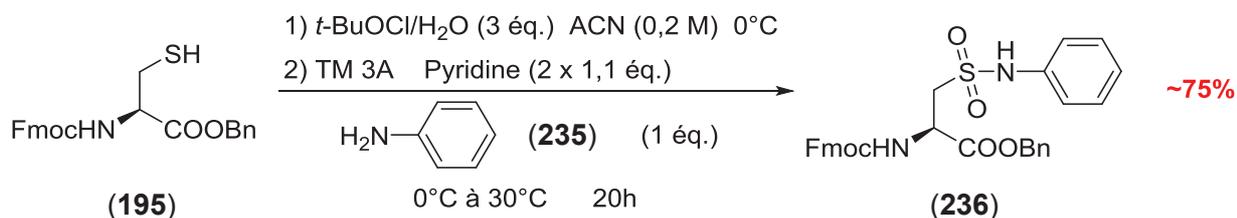


Schéma 103 : Etude du couplage entre la cystéine ester de benzyle (**195**) et l'aniline (**235**)

Pour tenter de capter ces cations chlore, de l'amylène est introduite dans le mélange réactionnel à hauteur d'un équivalent au début de l'étape d'amidation avec l'aniline (**235**). Cependant, aucune diminution de la quantité de produit mono-chloré n'a pu être observée, ce qui signifie que la chloration a probablement lieu lors de l'étape d'oxydation/chloration et donc que les chlores seraient situés sur les cycles aromatiques du benzyle ou du groupement 9-fluorényle. Les produits non chlorés et mono-chlorés sont inséparables et ne peuvent être caractérisés par RMN.

La deuxième amine aromatique engagée dans la réaction de couplage avec le chlorure de sulfonyle (**225**) est la *para*-nitroaniline (**84**), amine très désactivée de par sa fonction nitro en position *para*. Le produit couplé (**237**) est détecté après une analyse LC-MS. Cependant, alors que toute l'aniline (**235**) est consommée dans les essais présentés précédemment, ici la *para*-nitroaniline (**84**) n'est pas entièrement consommée. De plus, le produit désiré (**237**) ne peut être purifié par une

chromatographie sur gel de silice, à cause de la co-élution avec la *para*-nitroaniline (**84**), ni par HPLC, en phase inverse, car le produit désiré (**237**) présente le même temps de rétention qu'une impureté. La cystéine *para*-nitrophénylamino-sulfonyle (**237**) n'a donc pas pu être isolée, ni même quantifiée par HPLC. Néanmoins, après une chromatographie sur gel de silice, la fraction de mélange entre le produit (**237**) et la *para*-nitroaniline (**84**) présente une proportion d'environ 50/50 entre ces deux produits. Un rendement approximatif de moins de 25% a pu être déduit (Schéma 104).

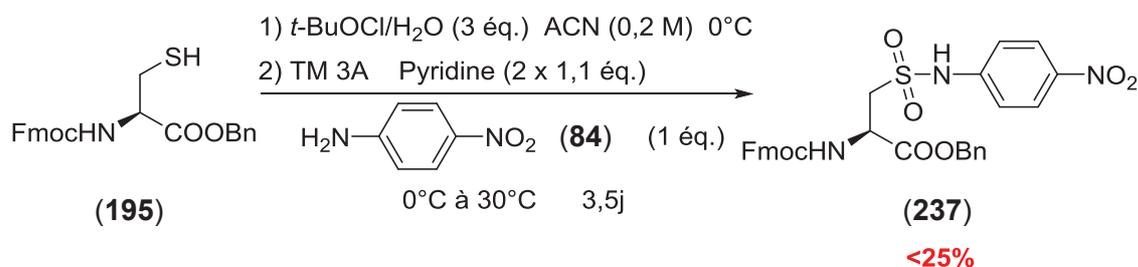


Schéma 104 : Etude du couplage entre la cystéine ester de benzyle (**195**) et la *para*-nitroaniline (**84**)

On peut conclure qu'une fois en présence d'une amine aromatique désactivée par un groupement électroattracteur en position *para*, le taux de conversion chute drastiquement (Entrée 1, Tableau 37). Des essais d'optimisation de cette réaction sont donc réalisés. La quantité de cystéine (**195**) est augmentée ainsi que la température. Néanmoins, même après 5 jours de réaction la conversion de l'amine (**84**), est toujours très faible et les impuretés sont majoritaires (Entrée 2, Tableau 37). La cinétique de la réaction est donc étudiée. Même après 26 jours de réaction la conversion est toujours faible avec en majorité des impuretés (Entrée 3, Tableau 37). La quantité d'amine (**84**) est diminuée à 0,3 équivalent tandis que la quantité de base et la concentration de la réaction sont augmentées. Mais, après plusieurs jours de réaction, les impuretés restent majoritaires et la conversion très faible (Entrées 4 et 5, Tableau 37).

Entrée	Eq. (195)	Eq. (84)	Eq. pyridine	Conc.	T°C	Temps	Résultat
1	1 éq.	1 éq.	2,2 éq. ^a	0,2 M	0 à 30°C	3,5j	impuretés majoritaires
2	2 éq. ^a	1 éq.	2,2 éq. ^a	0,2 M	0 à 40°C	5j	impuretés majoritaires
3	1 éq.	1 éq.	1,1 éq.	0,2 M	0 à 40°C	26j	impuretés majoritaires
4	1 éq.	0,3 éq.	4 éq.	0,3 M	0 à 30°C	7j	impuretés majoritaires
5	1 éq.	0,3 éq.	4 éq.	0,4 M	0 à 30°C	5j	impuretés majoritaires

a : addition en deux temps

Tableau 37 : Conditions explorées pour l'optimisation de la synthèse du sulfonamide (**237**)

En conclusion même en appliquant les conditions optimisées entre le SMX (**5**) et le chlorure de mésyle (**232**), la réaction entre le chlorure de sulfonyle (**195**) et la *para*-nitroaniline (**84**) ne mène qu'à une conversion très faible des réactifs. Par contre avec l'aniline (**235**) la réaction optimisée conduit à

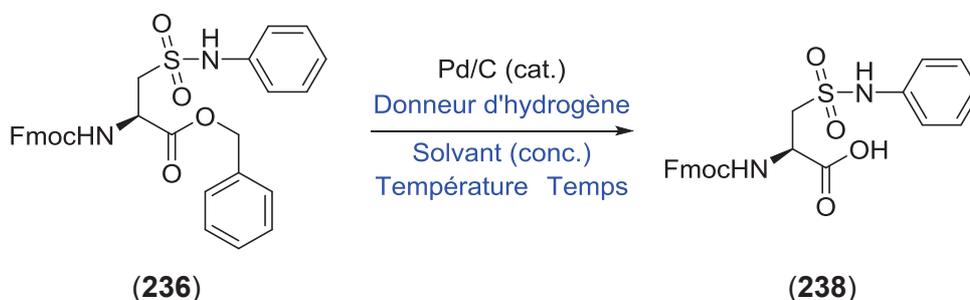
environ 75% de rendement. L'inconvénient est la présence des dérivés chlorés en mélange avec le produit (**236**). Pour déterminer si les chlores sont sur le groupement benzyle ou sur le 9-fluorényle, la déprotection du groupement benzyle est effectuée.

g) Clivage du groupement benzyle

La difficulté de cette étape de déprotection réside dans le fait que plusieurs publications relatent du clivage du groupement Fmoc par une hydrogénation catalytique.^{224,242,281,289} Pour autant, dans les mêmes conditions, d'autres décrivent de très bons rendements de déprotection de la fonction acide carboxylique sans atteindre le groupement Fmoc, même après des temps de réaction de 15h et plus.²⁸²⁻²⁸⁸

Nous devons alors tester le clivage de la fonction benzyle pour pouvoir attester de la viabilité de l'orthogonalité des groupements protecteurs choisis. Néanmoins, si les chlores sont additionnés sur le groupement benzyle, une hydrogénation catalytique peut ne pas suffire à son clivage. D'autres méthodes seront alors expérimentées.

Dans un premier temps des méthodes d'hydrogénation catalytique par transfert d'hydrogène ont été testées (Tableau 38). La plus connue emploie du cyclohexène. De plus, cette méthode est conseillée pour la déprotection d'ester de benzyle d'acides aminés contenant des sulfures.³¹⁷ Cependant, son application n'a pas mené au produit réduit escompté (**238**) (Entrée 1, Tableau 38). Le 1,4-cyclohexadiène est également utilisé, et connu pour déprotéger des peptides benzylés plus rapidement et à des températures plus basses. Cette méthode donne également de bons rendements lors de la déprotection d'acides aminés contenant des sulfures.³¹⁸ Même après deux jours de réaction, la débenzylation du produit (**236**) n'a pas lieu et le produit de départ est recouvert inchangé (Entrée 2, Tableau 38). Une autre méthode décrite par Elamin et ses collaborateurs préconise l'utilisation d'acide formique comme donneur d'hydrogène et solvant (à hauteur de 4,4% dans du méthanol).³¹⁹ Les auteurs utilisent du palladium précipité mais l'utilisation du palladium sur charbon est également possible pour le clivage d'esters de benzyle. Cependant même après 5 jours de réaction, seul du produit de départ (**236**) est récupéré (Entrée 3, Tableau 38). L'hydrogénation catalytique classique en présence de palladium sur charbon à 10% et d'hydrogène gazeux est donc expérimentée selon le protocole décrit par Qian *et al.*²⁸⁸ Le produit désiré (**238**) est alors obtenu avec 86% de rendement, sans que le soufre n'empoisonne le catalyseur (Entrée 4, Tableau 38).



Entrée	Donneur d'hydrogène	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Rdt
1	cyclohexène (0,12 M)	EtOH	0,04 M	reflux	15h	récupération du produit de départ
2	1,4-cyclohexadiène (10 éq.)	EtOH	0,25 M	TA	2j	récupération du produit de départ
3	acide formique (4,4% dans MeOH)	MeOH	0,04 M	TA	5j	récupération du produit de départ
4	H ₂	EtOH	0,10 M	TA	15h	86%

Tableau 38 : Différents essais de clivage du groupement benzyle du sulfonamide (236) par hydrogénation catalytique

Une analyse RMN ¹H de l'acide (238) montre que le groupement Fmoc n'est pas clivé lors de l'hydrogénolyse catalytique au palladium. De plus, une analyse par spectrométrie de masse du produit (238) atteste le départ du groupement benzyle, ainsi que celui des chlores. Les chlorations électrophiles, dues à l'hypochlorite de *tert*-butyle lors de l'étape d'oxydation/chloration de la cystéine, ont donc lieu sur le groupement benzyle.

La viabilité de l'orthogonalité des groupements protecteurs est donc prouvée par cette déprotection sélective du groupement benzyle.

h) Essais de synthèse du monomère Cys-SMX

Après l'optimisation des conditions de couplage entre la Fmoc-Cys-OBn (195) et différentes amines, ainsi que les optimisations de couplage entre le chlorure de mésyle (232) et le SMX (5), le couplage entre la Fmoc-Cys-OBn (195) et le sulfaméthoxazole (5) est donc entrepris. Les conclusions que nous pouvons tirer des différentes optimisations réalisées sont :

- L'acétonitrile reste le meilleur solvant pour cette réaction.
- L'utilisation de tamis moléculaire pour l'étape d'amidation améliore le rendement.
- La meilleure base pour l'étape d'amidation est la pyridine, un excès de cette dernière par rapport au SMX est conseillé et peut être introduit en plusieurs fois.
- Une concentration élevée amène à de meilleurs taux de conversion.
- La température de la réaction peut être augmentée entre 30 et 40°C.
- Un temps de réaction prolongé est nécessaire pour permettre une meilleure conversion du SMX (5).

Avec ces conditions mises au point, le couplage entre le chlorure de l'acide cystéique (**225**), et le sulfaméthoxazole (**5**) est réalisé (Schéma 105). Malheureusement nous n'avons pas été en mesure d'obtenir un rendement supérieur à 10%. De plus, le produit (**231**) obtenu après chromatographie sur gel de silice est toujours en mélange avec du composé mono-chloré (**239**). Pour permettre l'identification de ce dernier, une HPLC préparative est effectuée, et 4% du produit désiré (**231**) ainsi que 3% du produit mono-chloré (**239**) ont pu être isolés purs. Une analyse de RMN ^1H du produit (**239**) permet d'affirmer la position du chlore sur le cycle oxazole de par la disparition du signal du proton à 6,22 ppm (CDCl_3 , 400 MHz). Cette espèce chlorée n'est pas utilisable pour la suite de l'étude de l'allergie au sulfaméthoxazole (**5**) : les lymphocytes T risqueraient de ne pas reconnaître le motif SMX du fait de sa chloration. Les chlorations électrophiles dues à l'utilisation de l'hypochlorite de *tert*-butyle posent donc finalement un problème lorsque les conditions sont appliquées au SMX (**5**).

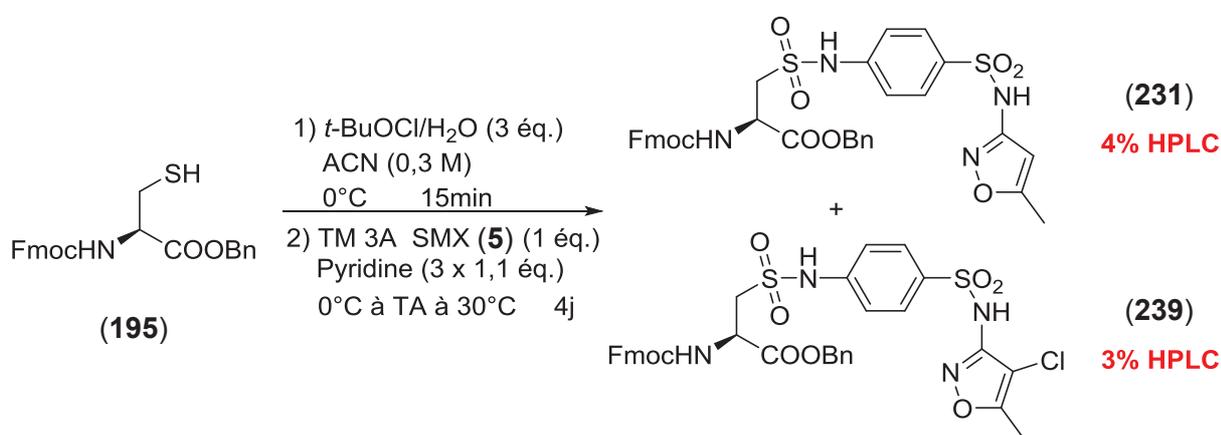


Schéma 105 : Synthèse de la Fmoc-Cys-OBn sulfonamide de sulfaméthoxazole (**231**)

Pour tenter d'activer l'amine aromatique du sulfaméthoxazole (**5**), une méthode sans base, mais utilisant la β -cyclodextrine (**240**) en quantité catalytique a été décrite par Sridhar et ses collaborateurs.³²⁰ Des amines aromatiques telles que l'aniline (**235**) ou des amines aromatiques désactivées comme la *para*-fluoroaniline (**241**) ont été couplées avec le chlorure de mésyle (**232**) pour former les sulfonamides (**242**) et (**243**) avec de très bons rendements (Schéma 106). La cyclodextrine est utilisée comme catalyseur dans cette réaction puisqu'elle possède des cavités hydrophobes qui lui permettent de se lier non-covalamment avec des substrats tels que les amines aromatiques, et ainsi d'engendrer la réaction avec le chlorure de mésyle (**232**).

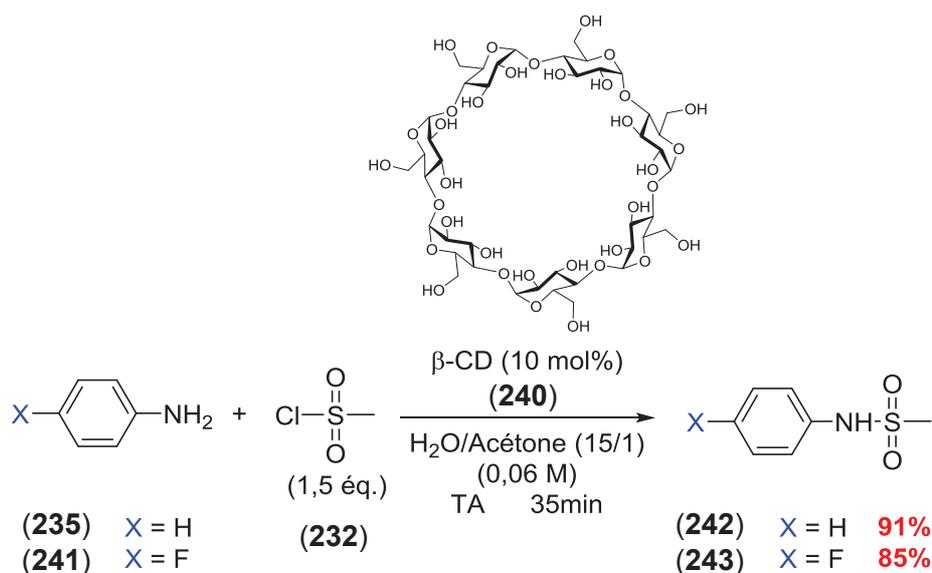


Schéma 106 : Synthèse des sulfonamides (242) et (243) à l'aide d'une quantité catalytique de β -cyclodextrine d'après Sridhar *et al.*³²⁰

La même méthode appliquée au couplage entre la cystéine (**195**) préalablement oxydée et chlorée suivant la méthode de Joyard *et al.* avec le SMX (**5**) est tentée.^{315,320} Néanmoins le sulfonamide désiré (**231**) n'est pas obtenu. Le pH de la solution devrait être contrôlé pour ne pas être inférieur à 1,5 où la forme ammonium du SMX domine. Or la β -cyclodextrine n'est que faiblement capable de se lier à la forme cationique du SMX.³²¹ Une base devra donc tout de même être ajoutée. Un autre problème rencontré lors de cette réaction est l'insolubilité du complexe β -CD (**240**)–SMX (**5**). Certaines publications relatent de l'utilisation du complexe entre la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (**244**) et le SMX (**5**) de par la plus grande solubilité de ce dernier dans l'eau.^{321,322} Le couplage pourra alors être testé à nouveau avec la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (**244**).

Malgré toutes les optimisations réalisées, ces conditions d'oxydation/chloration/amidation ne sont pas applicables au sulfaméthoxazole (**5**). Ce substrat présente une amine trop désactivée. De plus, il est sensible à la présence de chlores électrophiles induisant la formation d'un dérivé chloré non exploitable. La stratégie de synthèse du sulfonamide désiré (**231**) devra être repensée.

5) Changement de stratégie

En premier lieu le couplage entre la Fmoc-Cys-OBn (**195**) et le SMX (**5**) est réalisé dans des conditions biomimétiques. Pour ce faire, la cystéine (**195**) est mise en présence du dérivé nitroso du SMX (**54**), ou du dérivé hydroxylamine (**53**). Un agent oxydant, le *m*-CPBA, est ensuite additionné pour permettre l'oxydation du sulfinamide intermédiairement formé en sulfonamide. La présence du

produit désiré (**231**) est contrôlée par LC-MS. Les résultats à partir du dérivé nitroso du SMX (**54**) ne sont pas exploitables de par la trop grande quantité des dérivés de dégradation du nitroso (azo (**171**), azoxy (**172**)). Le mélange réactionnel à partir de l'hydroxylamine du sulfaméthoxazole (**53**) révèle sur le spectre HPLC-masse des traces du produit désiré (**231**), qui n'a pas pu être isolé.

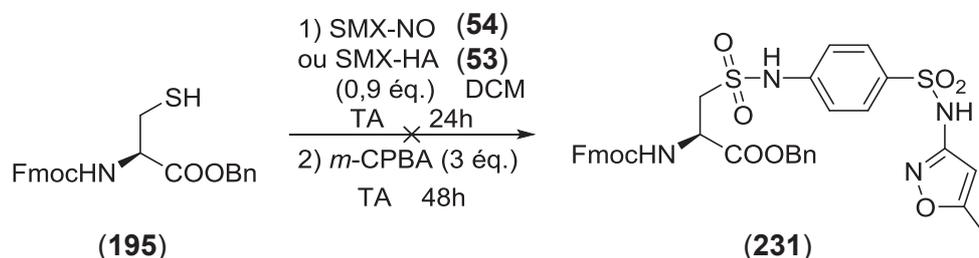


Schéma 107 : Tentative de synthèse du sulfonamide de sulfaméthoxazole (231**) via un couplage entre la cystéine (**195**) et les métabolites (**53**) (**54**) du SMX suivi d'une oxydation**

Une autre stratégie a ensuite été explorée. L'étude bibliographique sur la formation des sulfonamides est étendue à la coupure entre l'amine et l'aromatique du sulfaméthoxazole. Plusieurs publications décrivent la réaction entre des sulfonamides primaires et des dérivés aromatiques iodés (Schéma 108).³²³⁻³²⁸

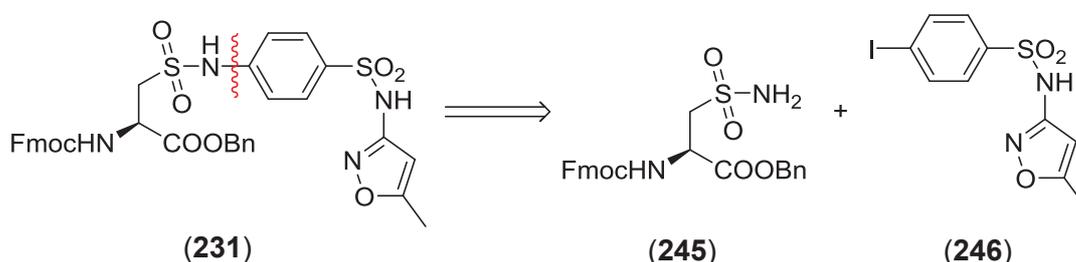


Schéma 108 : Deuxième voie rétrosynthétique possible pour la formation du sulfonamide (231**)**

Pour synthétiser le sulfonamide primaire (**245**), la Fmoc-Cys-OBn (**195**) est oxydée puis chlorée selon la méthode de Joyard et ses collaborateurs et un excès d'ammoniaque est ensuite introduit.³¹⁵ Le sulfonamide primaire (**245**) est obtenu avec un rendement modeste de 35%. Une analyse de masse sur ce composé purifié a cependant révélé la présence d'une espèce monochlorée. L'analyse par RMN ¹H n'a pas permis de la quantifier (Schéma 109).

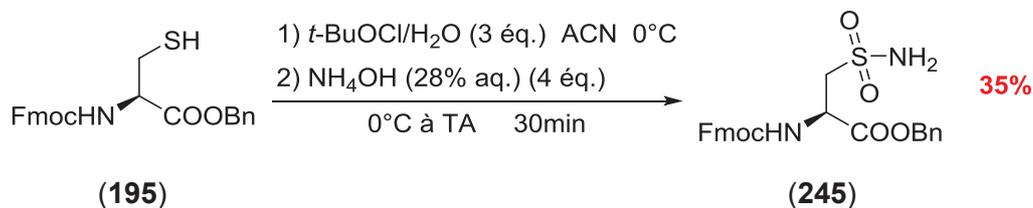


Schéma 109 : Synthèse du sulfonamide primaire (245) à partir du thiol (195)

Le couplage avec un dérivé aromatique est tout d'abord tenté avec l'iodobenzène (247). La méthode de couplage décrite par Tan *et al.* permet d'accéder aux sulfonamides par l'action d'une quantité catalytique d'oxyde de cuivre (I) en milieu basique.³²³ Cette méthode permet d'obtenir de très bons rendements au départ du méthanesulfonamide (232) et de l'iodobenzène (247). Par contre, dès l'introduction d'un dérivé iodé désactivé, ou d'un sulfonamide primaire possédant une chaîne carbonée plus longue, les rendements chutent à environ 65% (Schéma 110).

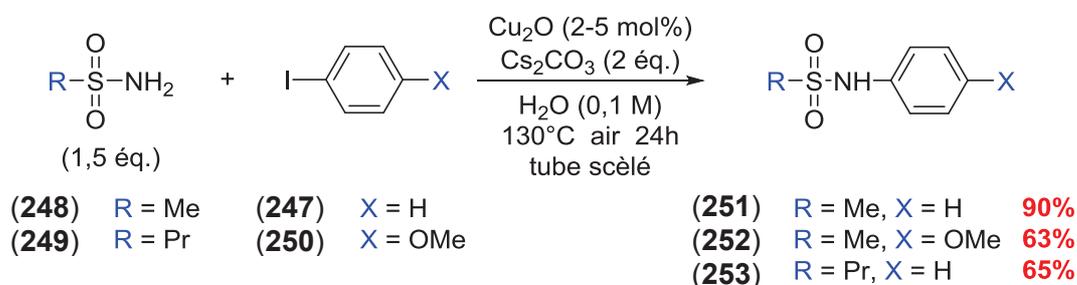


Schéma 110 : Méthode de couplage de Tan et ses collaborateurs³²³

Le mécanisme proposé par Tan *et al.* implique la coordination de l'azote du sulfonamide primaire (RSO_2NH_2) sur le cuivre (I), suivie d'une addition oxydante de l'halogénure d'aryle (X-Ar) menant au cuivre (III). L'élimination réductrice de ce dernier conduit au produit souhaité (RSO_2NHAr), ainsi qu'au recouvrement du catalyseur au degré d'oxydation I, qui est réengagé dans le cycle catalytique (Schéma 111).³²³

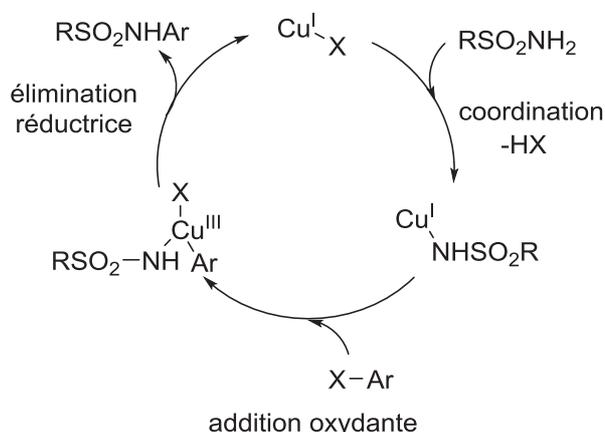


Schéma 111 : Mécanisme de couplage au cuivre proposé par Tan et ses collaborateurs³²³

Au départ du sulfonamide (**245**) dérivé de la cystéine, en présence de K_2CO_3 comme base, le sulfonamide (**236**) n'est pas obtenu et conduit à la dégradation des réactifs de départ, les conditions de chauffage étant probablement trop drastiques pour la molécule (Schéma 112).

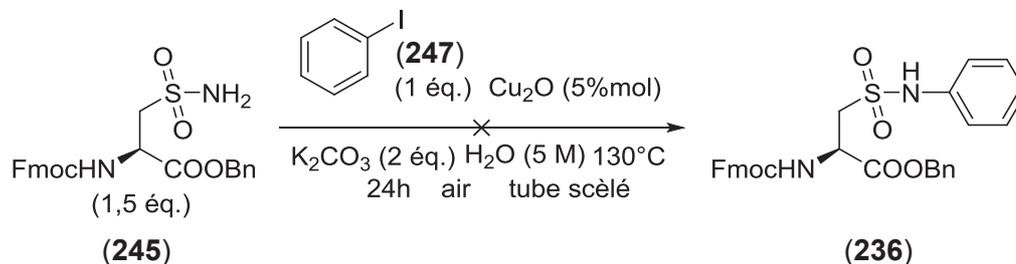


Schéma 112 : Tentative de synthèse du sulfonamide (**236**) par la méthode de Tan *et al.*³²³

Finalement toutes les méthodes de la bibliographie pour réaliser ce couplage rapportent l'utilisation de températures réactionnelles élevées (supérieures à 70°C), voire même l'utilisation des micro-ondes, quel que soit le catalyseur introduit.^{324–328} Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre sur cette voie.

Force est de constater que notre substrat Fmoc-Cys-OBn (**195**) semble peu enclin à subir des modifications dans les conditions explorées. L'analyse plus poussée des spectres de masse et de LC-MS effectués lors des différents essais d'oxydation montre la présence, dans les milieux réactionnels, d'une espèce présentant une masse de 495 g/mol, quel que soit l'agent d'oxydation ou celui de chloration utilisé. La structure de cette espèce n'a pas été élucidée. Cependant, la possibilité qu'elle puisse découler d'un réarrangement de notre substrat (**195**) et empêche sa bonne oxydation/chloration est émise. Pour tester la stabilité des groupements protecteurs de la cystéine (**195**) lors des conditions d'oxydation, de chloration et d'amidation, nous avons retenté ces différentes étapes au départ d'une cystéine protégée par des groupements peu clivables, en vue d'obtenir le sulfonamide (**254**) (Schéma 113).

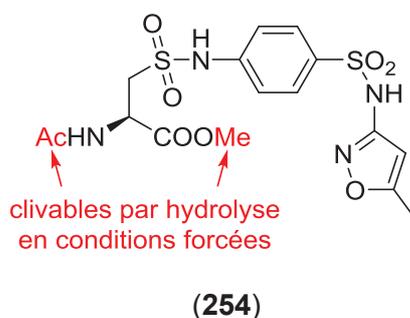


Schéma 113 : Nouvelle stratégie : synthèse du sulfonamide N-acétyl et ester de méthyle (**254**)

6) Nouvelle voie de synthèse via l'utilisation de groupements protecteurs peu labiles

Pour synthétiser le sulfonamide (**254**), la cystéine de départ doit être protégée sur ses fonctions amine primaire et acide carboxylique par des groupements acétyle et méthyle respectivement. La nouvelle stratégie consiste en l'oxydation préalable de la cystéine. Le produit de départ sera donc l'acide cystéique commercial (**198**).

a) Protection en acétamide et ester de méthyle

Au vu de la bibliographie, des méthodes de protection sélectives de l'amine de l'acide cystéique (**198**) via l'utilisation d'un chlorure d'acide ou d'un anhydride en présence d'une base sont décrites.^{329,330} De même, il existe des méthodes de protection sélectives de l'acide carboxylique en ester de méthyle, à partir de l'acide cystéique (**198**) et de chlorure de thionyle dans du méthanol.^{331,332} Il est à noter que l'utilisation de chlorure de thionyle n'agit pas sur la fonction acide sulfonique, même en présence de 20 équivalents de SOCl_2 , pendant 15h de réaction.

L'acide cystéique commercial (**198**) est transformé en acétamide désiré (**255**) par l'action de l'anhydride acétique en présence de soude.³³⁰ Après extraction, l'acétamide désiré (**255**) restant dans la phase aqueuse, il est directement engagé avec les sels dans l'étape suivante. En solution dans le méthanol avec un excès de chlorure de thionyle, l'ester de méthyle (**256**) est isolé avec un excellent rendement de 91% sur les deux étapes (Schéma 114).^{331,332}

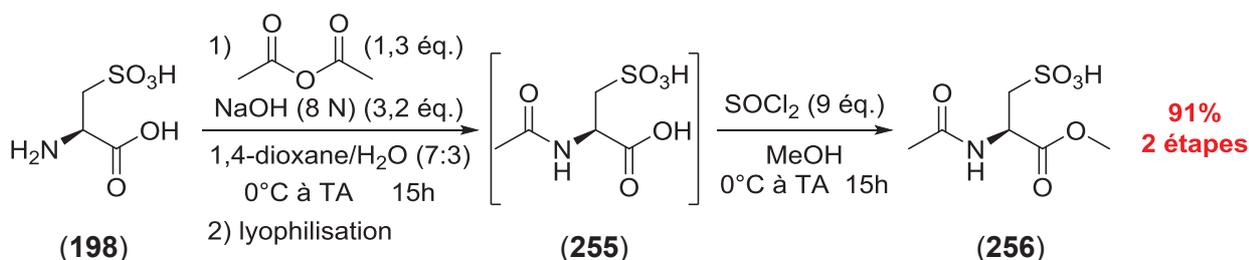


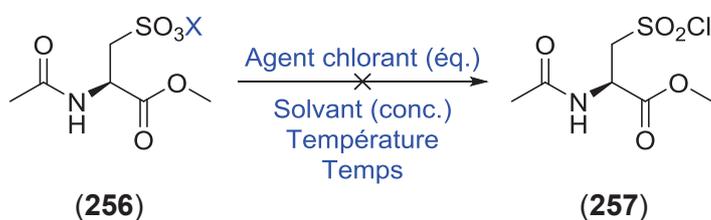
Schéma 114 : Synthèse de l'acide cystéique protégé (256)

Dans le but de contrôler l'obtention du produit (**256**) sous forme d'acide sulfonique, le dosage de la base conjuguée de cet acide est réalisé. Le pKa du produit (**256**) est dosé à 1,5, ce qui confirme la présence de la fonction acide sulfonique.

b) Substitution de l'acide sulfonique en chlorure de sulfonyle

L'étape suivante consiste en la formation du chlorure de sulfonyle (**257**) à partir de l'acide sulfonique (**256**). Pour ce faire, nous allons tirer profit de la précédente étude bibliographique présentée au Tableau 31 (p.181). Plusieurs tentatives de synthèse ont été réalisées et sont présentées dans le

Tableau 39 ci-après, mais aucune n'a permis d'obtenir le chlorure de sulfonyle escompté (**257**). Dans un premier temps des chlorations sur le sel de sodium du composé (**256**) sont réalisées avec du pentachlorure de phosphore ou du trichlorure de phosphoryle, mais le substrat de départ n'est pas soluble dans le dichlorométhane ce qui mène à la récupération du produit de départ (Entrée 1, Tableau 39).²⁹⁹ De plus, nous constatons qu'une température trop élevée conduit à une dégradation du produit (Entrée 2, Tableau 39).³³³ Lors des autres essais seul le produit de départ est récupéré, même après plusieurs jours de réaction (Entrées 3 et 4, Tableau 39).²⁹⁷ La méthode de Sureshbabu *et al.* au triphosgène est alors appliquée, ainsi que celle de Blotny à la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (TCT), mais le produit de départ est recouvert inchangé (Entrées 5 et 6, Tableau 39).^{295,301} Pour finir, des essais au chlorure de thionyle sont tout de même réalisés mais en ajoutant une quantité catalytique de DMF ou de la pyridine pour accéder à des espèces chlorantes plus réactives. La température est même augmentée jusqu'à 50°C pour tenter de passer la possible barrière d'activation de la synthèse mais le produit de départ est toujours retrouvé intact (Entrées 7, 8 et 9, Tableau 39).

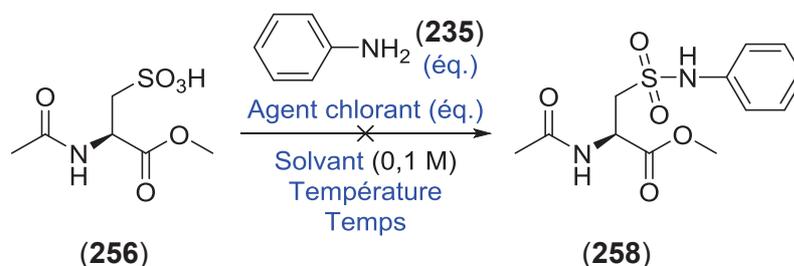


Entrée	Agent chlorant (éq.)	X	Solvant	Conc.	T°C	Temps	Résultat
1	PCl ₅ (1 éq.)	Na	DCM	0,10 M	0°C à TA	30min	récupération du produit de départ
2	POCl ₃ (2 éq.)	Na	ACN	0,10 M	reflux	3h	dégradation
3	POCl ₃ (2 éq.)	Na	ACN	0,10 M	TA	5j	récupération du produit de départ
4	-	Na	POCl ₃	0,02 M	0°C à TA	4j	récupération du produit de départ
5	triphosgène (0,7 éq.)	H	DCM/DMF (cat.)	0,10 M	0°C à TA	15h	récupération du produit de départ
6	TCT (1 éq.) + Et ₃ N (1 éq.)	H	acétone	0,50 M	reflux	20h	récupération du produit de départ
7	SOCl ₂ (3 éq.)	H	DCM/DMF (cat.)	0,10 M	0°C à TA	1h	récupération du produit de départ
8	SOCl ₂ (3 éq.)	H	DCM/DMF (cat.)	0,10 M	0°C à reflux	3h	récupération du produit de départ
9	SOCl ₂ (3 éq.)	H	pyridine	0,10 M	0 à 50°C	3h	récupération du produit de départ

Tableau 39 : Tentatives de synthèse du chlorure de sulfonyle (**257**)

c) Synthèse du sulfonamide à partir de l'acide sulfonique

Après l'échec de synthèse et d'isolement du chlorure de sulfonyle (**257**), l'hypothèse de sa faible stabilité est émise. Des tentatives de synthèse du sulfonamide, directement à partir de l'acide sulfonique (**256**) sont alors entreprises. Au vu de la faible réactivité du sulfaméthoxazole (**5**) avec les précédentes cystéines protégées, les essais sont dans un premier lieu réalisés avec l'aniline (**235**) (Tableau 40). L'acide sulfonique est placé dans un mélange à (1:1) d'aniline (**235**) et de toluène puis porté à reflux dans le but d'effectuer la déshydratation du substrat *via* l'élimination de l'eau formée grâce à un montage de Dean-Stark (Entrée 1, Tableau 40). Cependant, la formation du produit souhaité (**258**) n'a pas été observée et, après 24h, le produit de départ s'est décomposé probablement dû au chauffage prolongé. Les différents essais avec du chlorure d'oxalyle, du triphosgène ou du chlorure de thionyle comme agents chlorants n'ont également pas mené au sulfonamide souhaité (**258**), mais à la récupération des produits de départ (Entrées 2 à 5, Tableau 40).



Entrée	Agent chlorant (éq.)	Eq. (235)	Solvant	T°C	Temps	Résultat
1	-	excès	aniline (235) /toluène (1:1)	reflux (Dean-Stark)	24h	dégradation
2	(COCl) ₂ (2 éq.)	1,8 éq.	DCM	0°C à TA	15h	récupération des produits de départ
3	triphosgène (2 éq.)	2 éq.	DCM/DMF (cat.)	0°C à TA	15h	récupération des produits de départ
4	SOCl ₂ (2 éq.)	2 éq.	DCM	0°C à TA	22h	récupération des produits de départ
5	SOCl ₂ (1,1 éq.)	1,1 éq.	DMF	0°C à TA	15h	récupération des produits de départ

Tableau 40 : Essais de synthèse du sulfonamide (**258**)

7) Conclusion et perspectives sur la synthèse du monomère

En conclusion, malgré toutes les méthodes mises en œuvre pour obtenir la *N*-Fmoc cystéine sous forme sulfonamide de sulfaméthoxazole (**173**), aucune n'a porté ses fruits et la synthèse de ce monomère reste inachevée à la fin de cette thèse. Une autre stratégie de synthèse serait de

synthétiser le monomère désiré (**173**) à partir du sulfonamide protégé par un acétamide et un ester de méthyle (**254**). Ce dernier serait issu de l'oxydation/chloration/amidation de la *N*-acétyle cystéine ester de méthyle (**259**) commerciale avec le SMX (**5**) selon la méthode de Joyard *et al.*³¹⁵ Bien que cette méthode offre de faibles rendements, l'omission des groupements Fmoc et benzyle lors de la réaction d'oxydation/chloration/amidation pourrait améliorer l'efficacité de la réaction (Schéma 115).

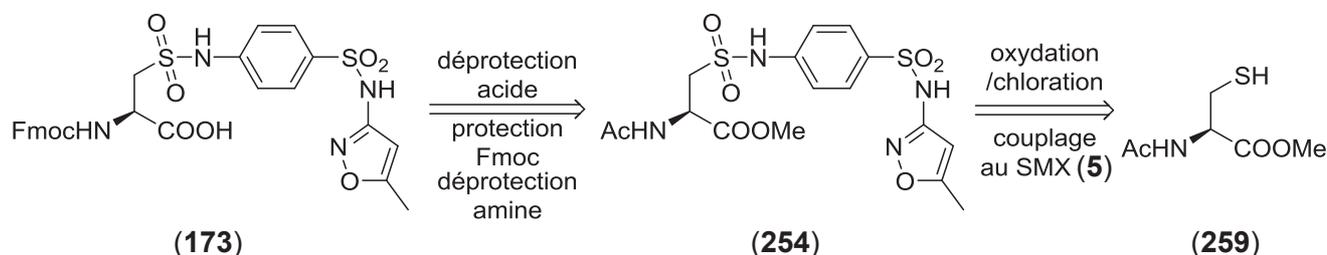


Schéma 115 : Autre stratégie de synthèse du sulfonamide (**173**) envisageable

Une autre stratégie possible pour obtenir le sulfonamide (**231**) consisterait en le couplage entre l'azoture de la cystéine protégée (**260**) et l'acide boronique du sulfaméthoxazole (**261**) (Schéma 116).

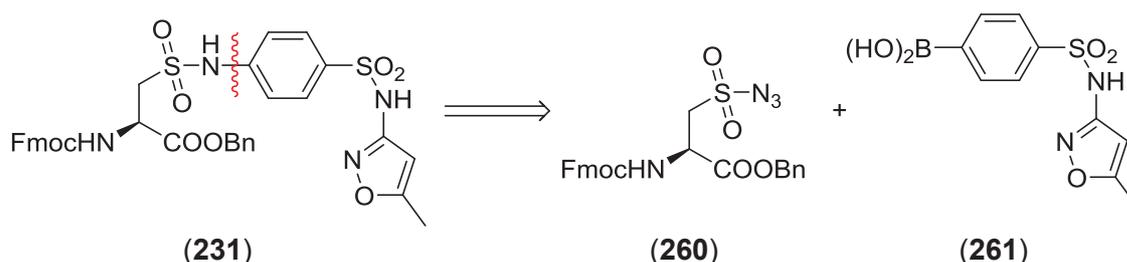


Schéma 116 : Autre stratégie d'obtention du sulfonamide (**231**)

Par exemple Moon et ses collaborateurs décrivent le couplage des azotures de sulfonyle (**262**) et (**263**) avec l'acide phénylboronique (**265**) et un acide plus désactivé le *para*-chlorophénylboronique (**264**), en présence d'un catalyseur de cuivre. La réaction se déroule à l'air et à température ambiante. Les sulfonamides (**266**) et (**267**) sont obtenus avec de très bons rendements (Schéma 117).³³⁴

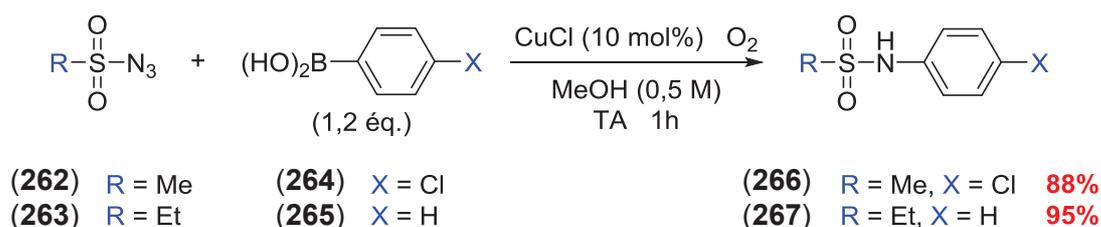


Schéma 117 : Couplage entre les azotures de sulfonyle (**262**) et (**263**) et les acides boroniques (**264**) et (**265**) d'après Moon *et al.*³³⁴

Plusieurs méthodes ont déjà été décrites pour synthétiser un azoture de sulfonamide à partir d'un thiol, pour ce faire le thiol doit d'abord être oxydé et chloré en chlorure de sulfonyle, puis l'action de l'azoture de sodium (en quantité stœchiométrique ou en léger excès) permet d'obtenir l'azoture de sulfonamide avec de bons rendements.³³⁵⁻³³⁷ De plus, les groupements Fmoc résistent à ces conditions.³³⁵ Pour ce qui est du SMX (**5**), une méthode décrite par Erb et ses collaborateurs permet de passer facilement de l'amine à l'acide boronique par l'action du nitrite de sodium suivi de l'acide diboronique.^{338,339}

IV. Conclusion

En définitive, les métabolites du sulfaméthoxazole (**5**) : l'hydroxylamine (**53**) et le nitroso (**54**) ont été synthétisés avec des rendements globaux respectifs de 43% sur 2 étapes et de 13% sur 3 étapes. De plus, la pureté du métabolite hydroxylamine étant supérieure à celle du dérivé nitroso c'est finalement le SMX-HA (**53**) qui a été utilisé pour la synthèse du bioconjugué HSA-SMX selon le mode opératoire décrit par Peng et Turesky.¹⁶³ Ce monomère a donc été synthétisé et les analyses de spectrométrie de masse de ce dernier sont en cours pour attester du couplage entre l'hydroxylamine du sulfaméthoxazole (**53**) et la cystéine 34 de la HSA.

Basé sur la cystéine 34, le choix des peptides potentiellement immunogènes a pu être effectué. Trois peptides ont été sélectionnés grâce à la modélisation par le logiciel IEDB, ainsi qu'un peptide qui servira de contrôle négatif (*cf.* Tableau 29 p.169).

La synthèse du monomère Cys-SMX (**173**) a alors été entreprise. Au vu de la plus grande stabilité des dérivés sulfonamides, c'est sous cette forme que le monomère a tenté d'être synthétisé. Les étapes de protection et de déprotection ont pu être optimisées, par contre, l'oxydation et la chloration en chlorure de sulfonyle, ainsi que le couplage avec le sulfaméthoxazole (**5**) ont été peu fructueux. Malgré tous les essais réalisés ainsi que les nombreuses optimisations, nous n'avons pas été en mesure d'isoler en quantité suffisante le monomère désiré (**173**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, le but de cette thèse était de sélectionner et de synthétiser des peptides potentiellement immunogènes, modifiés par les trois antibiotiques de cette étude : la pénicilline G (**7**), l'amoxicilline (**4**), et le sulfaméthoxazole (**5**).

La première partie du travail a consisté en la préparation de bioconjugués HSA-pénicilline (pénicilline G et amoxicilline) *in vitro* dans des conditions de pH physiologique et de pH basique. Leurs analyses par spectrométrie de masse ont permis d'accéder à la nature et au nombre d'acides aminés modifiés lors de l'hapténisation. Seules les lysines réagissent avec les pénicillines et le nombre de lysines modifiées est résumé dans le Tableau 41. Des digestions trypsiques suivies d'analyses par spectrométrie de masse tandem couplée à l'HPLC ont permis d'identifier dans la séquence de la HSA les positions des lysines conjuguées à l'haptène. Seules les lysines précédemment identifiées dans des études *in vivo* ont été sélectionnées pour concevoir des peptides potentiellement immunogènes (Tableau 41).¹⁰³

Bioconjugué	Nombre moyen de pénicilline fixée à la HSA	Nombre de lysine identifiée hapténisée par la pénicilline	Nombre de lysine sélectionnée pour la suite de l'étude
HSA-PG-pH 7,4	1 à 6 avec en moyenne N = 3	21	12
HSA-AX-pH 7,4	0 à 3 avec en moyenne N = 0	10	8
HSA-PG-pH 10,6	Lot 1 : 11 à 19 avec en moyenne N = 15	50	-
	Lot 2 : 13 à 22 avec en moyenne N = 17	51	-
HSA-AX-pH 10,6	4 à 10 avec en moyenne N = 6 et 7	-	-

Tableau 41 : Récapitulatif des résultats de spectrométrie de masse obtenus pour les bioconjugués HSA-PG et HSA-AX réalisés dans des conditions de couplage à pH physiologique et à pH basique

De manière similaire, le bioconjugué HSA-sulfaméthoxazole a été préparé dans des conditions de pH physiologique. Le SMX (**5**) étant un pro-haptène, le dérivé hydroxylamine du SMX (**53**), un de ses principaux métabolites, a été synthétisé en vue d'être couplé à la cystéine 34 de la HSA. Sachant que cette hapténisation, conduit à un intermédiaire sulfinamide, instable, une oxydation du bioconjugué obtenu après la phase d'incubation est réalisée dans le but de stabiliser l'adduit sous la forme d'un sulfonamide. Les analyses par spectrométrie de masse sur ce bioconjugué sont actuellement en cours.

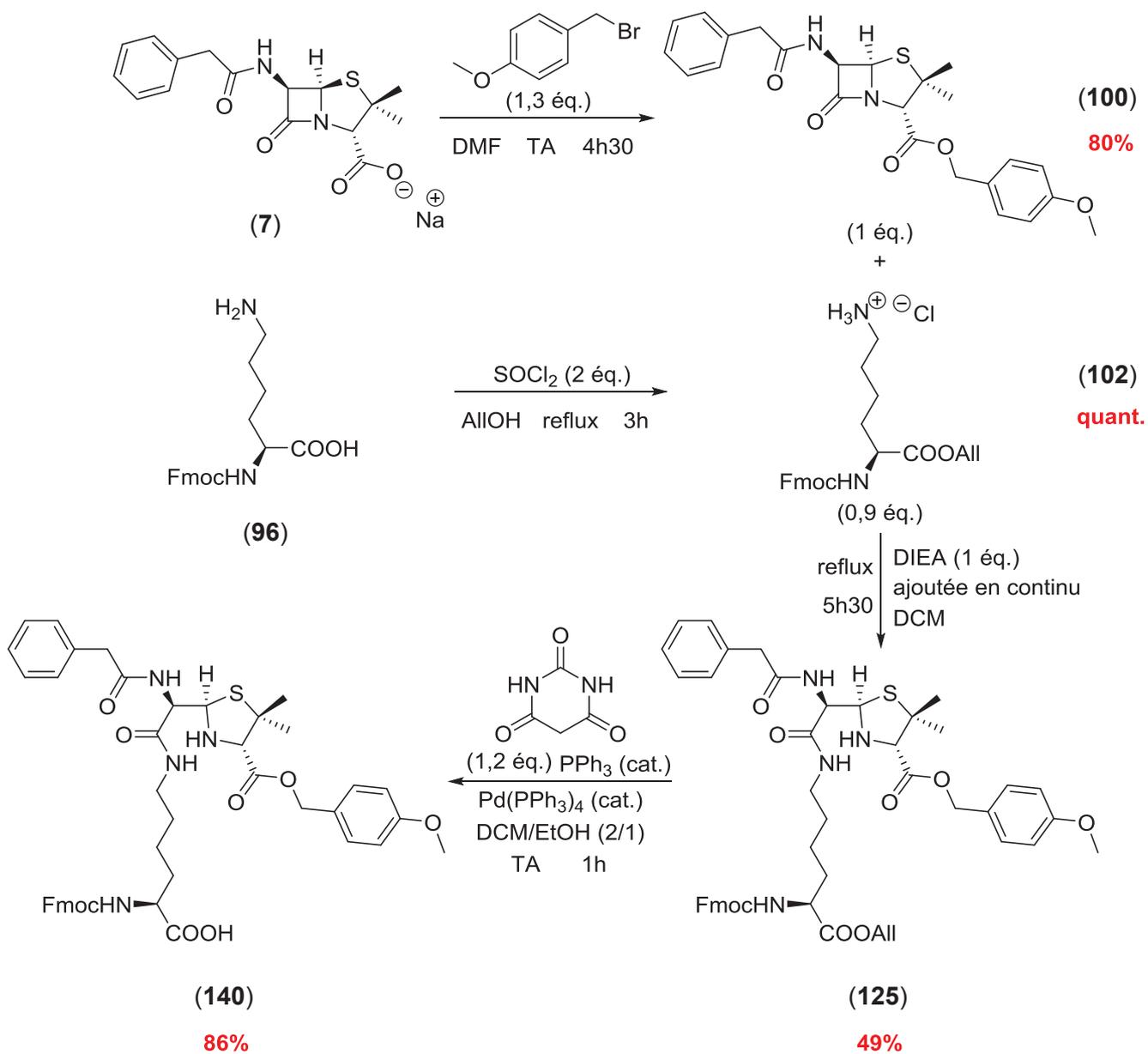
La deuxième partie du travail a consisté en la sélection d'un ou plusieurs peptides de 15-mers les plus potentiellement immunogènes, pour chaque acide aminé hapténisé sélectionné. Dans ce but, deux techniques de modélisation moléculaire ont été utilisées. Les critères à prendre en compte sont la probabilité d'accroche entre les peptides et les molécules HLA ainsi que la bonne orientation de l'acide aminé d'intérêt dans la poche du HLA, de manière à ce que l'antibiotique soit dirigé vers le

lymphocyte T. Pour ce faire, parmi tous les allèles des HLA-DRB1 nous avons décidé de travailler sur les plus représentés dans la population caucasienne. Grâce à ces études de modélisation, un à trois peptides par acide aminé ont été sélectionnés comme étant les plus potentiellement immunogènes parmi les 195 peptides possibles (Tableau 42). Des peptides ne montrant pas de bons résultats de modélisation, ont également été sélectionnés comme contrôles négatifs, en vue d'approuver les méthodes de sélection et les tests biologiques.

Antibiotiques étudiés	Acide aminé sélectionné	Peptides sélectionnés pour la synthèse
PG (7)	K137	LKK ₁₃₇ YLYEIARRHPYF
PG (7)	K159	PELLFFAK ₁₅₉ RYKAAFT
PG (7) et AX (4) (contrôle négatif)	K190	LRDEGK ₁₉₀ ASSAKQRLK
PG (7) et AX (4) (contrôle négatif)	K195	LRDEGKASSAK ₁₉₅ QRLK et SSAK ₁₉₅ QRLKCASLQKF
PG (7) (contrôle négatif)	K199	LRDEGKASSAKQRLK ₁₉₉ et SSAKQRLK ₁₉₉ CASLQKF
PG (7) et AX (4)	K212	FGERAFK ₂₁₂ AWAVARLS
PG (7) et AX (4)	K351	VVLLLRLAK ₃₅₁ TYETTL
PG (7) et AX (4)	K432	TPTLVEVSRNLGK ₄₃₂ VG
PG (7) et AX (4)	K436	VEVSRNLGKVGSK ₄₃₆ CC
PG (7) et AX (4)	K525	KERQIKK ₅₂₅ QTALVELV
PG (7) et AX (4)	K541	LVELVKHKPKATK ₅₄₁ EQ
PG (7)	K545	KEQLK ₅₄₅ AVMDDFAAFV
SMX (5)	C34	ALVLIAFAQYLQQC ₃₄ P et LIAFAQYLQQC ₃₄ PFED et YLQQC ₃₄ PFEDHVKLVN
SMX (5) (contrôle négatif)	C34	AQYLQQC ₃₄ PFEDHVKL

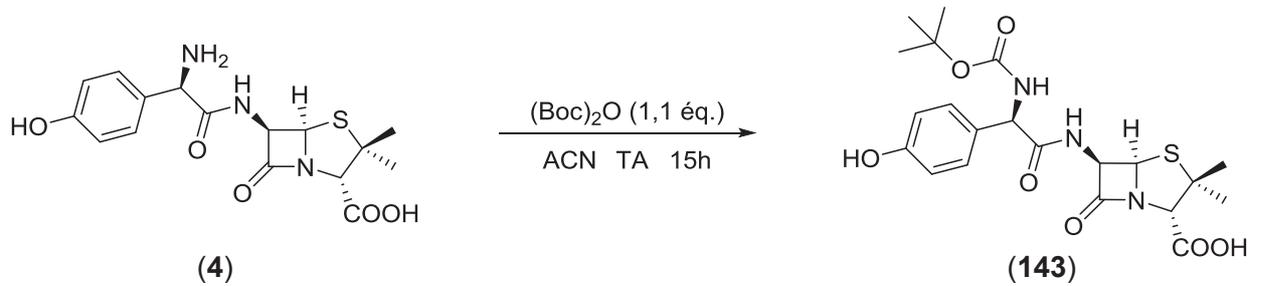
Tableau 42 : Peptides sélectionnés en vue d'être synthétisés

Pour synthétiser ces 18 peptides, nous avons décidé de passer par la synthèse de monomères acide aminé-antibiotique stables, qui pourront être intégrés dans la synthèse de chacun des peptides sélectionnés *via* la méthodologie Fmoc. La dernière partie de cette thèse a donc consisté en la synthèse de ces trois monomères : lysine-pénicilline G (**140**), lysine-amoxicilline (**166**), et cystéine-SMX (**173**). Dans un premier temps le monomère Lys-PG (**140**) a été synthétisé en 4 étapes, à l'échelle du gramme, avec un rendement global de 34%. L'étape clé de cette synthèse a résidé dans l'ouverture du cycle β -lactame de la pénicilline G (**100**) par la lysine (**102**) orthogonalement protégée (Schéma 118).

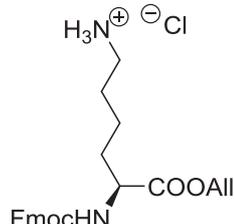
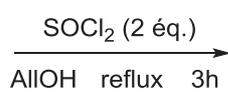
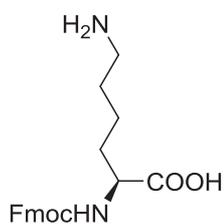
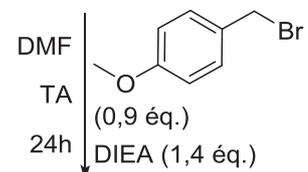


Sch\u00e9ma 118 : Synth\u00e8se du monom\u00e8re Lys-PG (140)

Dans un deuxi\u00e8me temps le monom\u00e8re Lys-AX (**166**) a \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9 sur le mod\u00e8le de la synth\u00e8se du monom\u00e8re Lys-PG (**140**), en 5 \u00e9tapes, \u00e0 l'\u00e9chelle du gramme, avec un rendement global de 47% (Sch\u00e9ma 119).

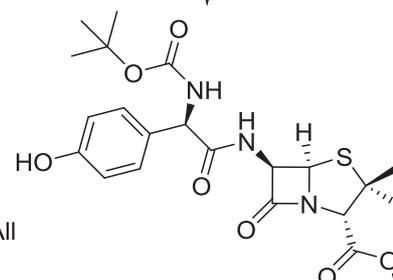


quant.



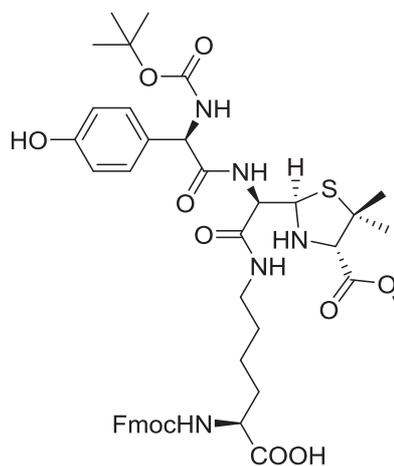
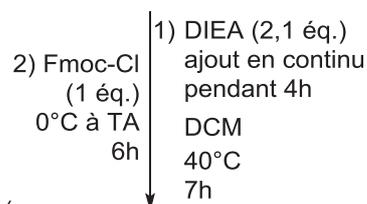
quant.

(1,2 \u00e9q.)



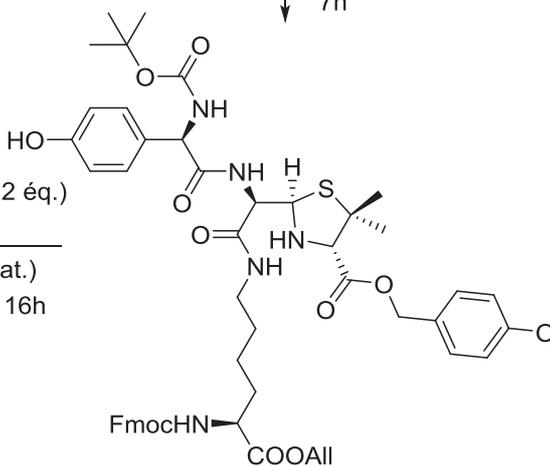
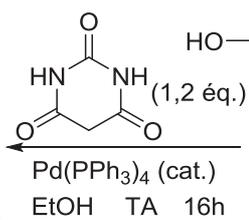
77%

(1 \u00e9q.)



+ 20% de (167)

89%



+ 20% de (165)

68%

Sch\u00e9ma 119 : Synth\u00e8se du monom\u00e8re Lys-AX (166)

En dernier lieu la synthèse du monomère cystéine-sulfaméthoxazole (**173**) a été étudiée mais n'a malheureusement pas pu aboutir. Si nous avons été en mesure de synthétiser des précurseurs SMX (**5**) et cystéine oxydée protégés, l'étape limitante reste le couplage entre ces deux espèces.

Les 14 peptides sélectionnés pour l'étude sur la pénicilline G (**7**) ont finalement été synthétisés avec succès selon la stratégie Fmoc par la société Proteogenix *via* l'utilisation du monomère lysine-pénicilline G (**140**). La viabilité de notre méthodologie a donc été approuvée. Les synthèses des 9 peptides pour l'étude sur l'amoxicilline (**4**) *via* le monomère lysine-amoxicilline (**166**) sont, quant à elles, en cours. Les tests d'activation des lymphocytes T CD4+ avec les peptides modifiés par la pénicilline G (**7**) ont été réalisés par Marie Eliane Azoury, et constitueront les résultats de sa thèse. Ils sont prometteurs et confirment la méthode de modélisation de sélection des peptides, ainsi que la possible application de ces tests comme diagnostic d'une réaction allergique.

Les perspectives de ce travail de thèse sont multiples de par l'étendue que peut prendre ce projet. Dans un premier temps, la synthèse du monomère cystéine-sulfaméthoxazole (**173**) sera poursuivie. Par ailleurs, les 4 peptides sélectionnés pour cette étude ne contenant qu'une seule cystéine, leur synthèse peut également être réalisée en incubant le peptide non modifié avec le SMX (**5**), comme décrit par Callan *et al.*,¹³⁵ puis en oxydant l'adduit formé en sulfonamide, selon la méthode de Peng et Turesky.¹⁶³ Pour ce qui est des modélisations *in silico*, la technique de la dynamique moléculaire va être étendue aux peptides sélectionnés pour l'étude sur le SMX (**5**) pour permettre d'affiner cette sélection. Plus idéalement, la co-cristallisation d'un HLA-DR présentant un peptide hapténisé à un récepteur d'un lymphocyte T permettrait de connaître la structure d'un TcR spécifique de l'antibiotique et ainsi d'améliorer nos techniques de sélection.

Pour ce qui est de l'étendue du sujet, d'autres antibiotiques peuvent être étudiés *via* la méthodologie mise en place au laboratoire, voire même d'autres familles de médicaments. Les myorelaxants sont, par exemple, responsables d'une grande partie des réactions allergiques mortelles et dangereuses et présentent donc un intérêt majeur pour la suite de ce projet.

De plus, l'étude des acides aminés hapténisés peut également être étendue à d'autres protéines du sérum. Par exemple, Ariza et ses collaborateurs ainsi que Magi *et al.* ont montré que la transferrine était également une protéine hapténisée par l'amoxicilline (**4**) et l'ampicilline (**34**).^{126,129}

A long terme, la suite de ces travaux fondamentaux peut être le développement d'un nouvel outil pharmacologique valorisable pour l'élaboration d'un test diagnostique universel, plus sensible, permettant de faciliter le travail des allergologues. Par l'utilisation de peptides hapténisés à la place de protéines hapténisées, les tests de diagnostic allergique présenteront une sensibilité accrue.³⁴⁰

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Johansson, S. G. O.; Hourihane, J. O.; Bousquet, J.; Bruijnzeel-Koomen, C.; Dreborg, S.; Haahtela, T.; Kowalski, M. L.; Mygind, N.; Ring, J.; Van Cauwenberge, P.; Van Hage-Hamsten, M.; Wüthrich, B. A Revised Nomenclature for Allergy. *Allergy* **2001**, *56* (9), 813–824.
- (2) Thong, B. Y.-H.; Tan, T.-C. Epidemiology and Risk Factors for Drug Allergy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *71* (5), 684–700.
- (3) World Health Organization. International Drug Monitoring the Role of National Centers. *World Heal. Organ. Tech. Rep. Ser.* **1972**, *498*, 1–25.
- (4) Demoly, P. Les Allergies Médicamenteuses. *mt pédiatrie* **2007**, *10* (1), 34–43.
- (5) Vervloet, D.; Durham, S. ABC of Allergies. Adverse Reactions to Drugs. *Brit. Med. J.* **1998**, *316* (7143), 1511–1514.
- (6) Gomes, E.; Cardoso, M. F.; Praça, F.; Gomes, L.; Mariño, E.; Demoly, P. Self-Reported Drug Allergy in a General Adult Portuguese Population. *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34* (10), 1597–1601.
- (7) Ponvert, C.; Perrin, Y.; Bados-Albiero, A.; Le Bourgeois, M.; Karila, C.; Delacourt, C.; Scheinmann, P.; De Blic, J. Allergy to Beta-Lactam Antibiotics in Children: Results of a 20-Year Study Based on Clinical History, Skin and Challenge Tests. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2011**, *22* (4), 411–418.
- (8) Sampson, H. A.; Muñoz-Furlong, A.; Campbell, R. L.; Adkinson, N. F.; Bock, S. A.; Branum, A.; Brown, S. G. A.; Camargo, C. A.; Cydulka, R.; Galli, S. J.; Gidudu, J.; Gruchalla, R. S.; Harlor, A. D.; Hepner, D. L.; Lewis, L. M.; Lieberman, P. L.; Metcalfe, D. D.; O'Connor, R.; Muraro, A.; Rudman, A.; Schmitt, C.; Scherrer, D.; Simons, F. E. R.; Thomas, S.; Wood, J. P.; Decker, W. W. Second Symposium on the Definition and Management of Anaphylaxis: Summary Report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117* (2), 391–397.
- (9) Roujeau, J.-C. Syndromes de Lyell et de Stevens-Johnson. *Rev. Prat.* **2007**, *57* (11), 1165–1170.
- (10) Pichler, W. J.; Wendland, T.; Hausmann, O.; Schnyder, B.; Fricker, M.; Pichler, C.; Helbling, A. Syndrome DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms). *Forum Med. Suisse* **2011**, *11* (48), 879–884.
- (11) Descotes, J.; Choquet-Kastylevsky, G. Gell and Coombs's Classification: Is It Still Valid? *Toxicology* **2001**, *158* (1-2), 43–49.
- (12) Gell, P. G. H.; Coombs, R. R. A. *Clinical Aspects of Immunology*, 1st Ed.; Blackwell Scientific, Ed.; Oxford, 1963; pp 317–337.
- (13) Gell, P. G. H.; Coombs, R. R. A. *Clinical Aspects of Immunology*, 2nd Ed.; Blackwell Scientific, Ed.; Oxford, 1968; pp 575–596.
- (14) Rozieres, A.; Vocanson, M.; Ben Saïd, B.; Nosbaum, A.; Nicolas, J.-F. Role of T Cells in Nonimmediate Allergic Drug Reactions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *9* (4), 305–310.

- (15) Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A. *Immunologie - Le Cours de Janis Kuby*, 6th Ed.; Dunod, Ed.; Paris, 2008; p 684.
- (16) Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. *Les Bases de L'immunologie Fondamentale et Clinique*, 3rd Ed.; Elsevier, Ed.; Hong-Kong, 2008; p 283.
- (17) Hackstein, H.; Thomson, A. W. Dendritic Cells: Emerging Pharmacological Targets of Immunosuppressive Drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4* (1), 24–34.
- (18) Caubet, J.-C.; Pichler, W. J.; Eigenmann, P. A. Educational Case Series: Mechanisms of Drug Allergy. *Pediatr. Allergy Immu.* **2011**, *22* (6), 559–567.
- (19) Naisbitt, D. J.; Gordon, S. F.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Immunological Principles of Adverse Drug Reactions The Initiation and Propagation of Immune Responses Elicited by Drug Treatment. *Drug Saf.* **2000**, *23* (6), 483–507.
- (20) Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J. Exp. Med.* **1935**, *61* (10), 643–657.
- (21) Posadas, S. J.; Pichler, W. J. Delayed Drug Hypersensitivity Reactions - New Concepts. *Clin. Exp. Allergy* **2007**, *37* (7), 989–999.
- (22) Gill, H. J.; Hough, S. J.; Naisbitt, D. J.; Maggs, J. L.; Kitteringham, N. R.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. The Relationship between the Disposition and Immunogenicity of Sulfamethoxazole in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *282* (2), 795–801.
- (23) Naisbitt, D. J.; Hough, S. J.; Gill, H. J.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R.; Park, B. K. Cellular Disposition of Sulphamethoxazole and Its Metabolites: Implications for Hypersensitivity. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126* (6), 1393–1407.
- (24) Chipinda, I.; Hettick, J. M.; Siegel, P. D. Haptenation: Chemical Reactivity and Protein Binding. *J. Allergy* **2011**, *2011* (ID 839682), 1–11.
- (25) Lepoittevin, J.-P. Metabolism versus Chemical Transformation or Pro- versus Prehapten? *Contact Dermatitis* **2006**, *54* (2), 73–74.
- (26) Von Greyerz, S.; Burkhart, C.; Pichler, W. J. Molecular Basis of Drug Recognition by Specific T-Cell Receptors. *Int. Arch. Allergy Imm.* **1999**, *119* (3), 173–180.
- (27) Neefjes, J.; Jongasma, M. L. M.; Paul, P.; Bakke, O. Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11* (12), 823–836.
- (28) Weltzien, H. U.; Padovan, E. Molecular Features of Penicillin Allergy. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *110* (3), 203–206.
- (29) Padovan, E.; Mauri-Hellweg, D.; Pichler, W. J.; Weltzien, H. U. T Cell Recognition of Penicillin G: Structural Features Determining Antigenic Specificity. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26* (1), 42–48.
- (30) Mauri-Hellweg, D.; Bettens, F.; Mauri, D.; Brander, C.; Hunziker, T. Activation of Drug-Specific CD4+ and CD8+ T Cells in Individuals Allergic to Sulfonamides, Phenytoin, and Carbamazepine. *J. Immunol.* **1995**, *155* (1), 462–472.
- (31) Schnyder, B.; Burkhart, C.; Schnyder-Frutig, K.; von Greyerz, S.; Naisbitt, D. J.; Pirmohamed, M.; Park, B. K.; Pichler, W. J. Recognition of Sulfamethoxazole and Its Reactive Metabolites by Drug-Specific CD4+ T Cells from Allergic Individuals. *J. Immunol.* **2000**, *164* (12), 6647–6654.

- (32) Burkhart, C.; von Greyerz, S.; Depta, J. P.; Naisbitt, D. J.; Britschgi, M.; Park, K. B.; Pichler, W. J. Influence of Reduced Glutathione on the Proliferative Response of Sulfamethoxazole-Specific and Sulfamethoxazole-Metabolite-Specific Human CD4⁺ T-Cells. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132* (3), 623–630.
- (33) Castrejon, J. L.; Berry, N.; El-Ghaiesh, S.; Gerber, B.; Pichler, W. J.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. Stimulation of Human T Cells with Sulfonamides and Sulfonamide Metabolites. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125* (2), 411–418.
- (34) Brander, C.; Mauri-Hellweg, D.; Bettens, F.; Rolli, H.; Goldman, M.; Pichler, W. J. Heterogeneous T Cell Responses to Beta-Lactam-Modified Self-Structures Are Observed in Penicillin-Allergic Individuals. *J. Immunol.* **1995**, *155* (5), 2670–2678.
- (35) Rozieres, A.; Hennino, A.; Rodet, K.; Gutowski, M.-C.; Gunera-Saad, N.; Berard, F.; Cozon, G.; Bienvenu, J.; Nicolas, J.-F. Detection and Quantification of Drug-Specific T Cells in Penicillin Allergy. *Allergy* **2009**, *64* (4), 534–542.
- (36) Gaspard, I.; Guinnepain, M.-T.; Laurent, J.; Bachot, N.; Kerdine, S.; Bertoglio, J.; Pallardy, M.; Lebrec, H. IL-4 and IFN-Gamma mRNA Induction in Human Peripheral Lymphocytes Specific for Beta-Lactam Antibiotics in Immediate or Delayed Hypersensitivity Reactions. *J. Clin. Immunol.* **2000**, *20* (2), 107–116.
- (37) Lebrec, H.; Kerdine, S.; Gaspard, I.; Pallardy, M. Th1/Th2 Responses to Drugs. *Toxicology* **2001**, *158* (1-2), 25–29.
- (38) Nhim, C.; Delluc, S.; Halgand, F.; de Chaisemartin, L.; Weaver, R. J.; Claude, N.; Joseph, D.; Maillère, B.; Pallardy, M. Identification and Frequency of Circulating CD4(+) T Lymphocytes Specific to Benzylpenicillin in Healthy Donors. *Allergy* **2013**, *68* (7), 899–905.
- (39) Pichler, W. J. Modes of Presentation of Chemical Neoantigens to the Immune System. *Toxicology* **2002**, *181-182*, 49–54.
- (40) Pichler, W. J. Delayed Drug Hypersensitivity Reactions. *Ann. Intern. Med.* **2003**, *139* (8), 683–693.
- (41) Pichler, W. J.; Beeler, A.; Keller, M.; Lerch, M.; Posadas, S.; Schmid, D.; Spanou, Z.; Zawodniak, A.; Gerber, B. Pharmacological Interaction of Drugs with Immune Receptors: The P-I Concept. *Allergol. Int.* **2006**, *55* (1), 17–25.
- (42) Pichler, W. J. The P-I Concept : Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors. *World Allergy Organ. J.* **2008**, *1* (6), 96–102.
- (43) Demoly, P.; Bencherioua, A. M.; Kvedariene, V.; Messaad, D.; Sahla, H.; Benahmed, S.; Bousquet, J.; ENDA. Diagnostic Des Allergies Médicamenteuses : Questionnaire Européen. *Rev. Fr. Allergo. Immunol. Clin.* **2000**, *40* (4), 494–499.
- (44) Torres, M. J.; Romano, A.; Mayorga, C.; Moya, M. C.; Guzman, A. E.; Reche, M.; Juarez, C.; Blanca, M. Diagnostic Evaluation of a Large Group of Patients with Immediate Allergy to Penicillins: The Role of Skin Testing. *Allergy* **2001**, *56* (9), 850–856.
- (45) Brockow, K.; Romano, A.; Blanca, M.; Ring, J.; Pichler, W.; Demoly, P. General Considerations for Skin Test Procedures in the Diagnosis of Drug Hypersensitivity. *Allergy* **2002**, *57* (1), 45–51.
- (46) Co Minh, H.-B.; Demoly, P. Méthodologie et Préparation Des Tests Cutanés : Prick-Tests et Intradermoréactions À Lecture Immédiate. In *Le diagnostic de l'allergie aux médicaments*; John Libbey Eurotext, Ed.; Paris, 2005; pp 41–52.

- (47) Nicolas, J.-F.; Guillot, I.; Cousin, F.; Saad, N.; Nosbaum, A.; Berthoux, E.; Kerhoas, A.; Rozières, A.; Bienvenu, J.; Berard, F. Diagnostic de L'allergie Aux Médicaments : Place Des Tests Cutanés. In *Le diagnostic de l'allergie aux médicaments*; John Libbey Eurotext, Ed.; Paris, 2005; pp 7–16.
- (48) Solensky, R.; Khan, D. A. Evaluation of Antibiotic Allergy: The Role of Skin Tests and Drug Challenges. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2014**, *14* (9), 459.
- (49) Friedmann, P. S.; Ardern-Jones, M. Patch Testing in Drug Allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *10* (4), 291–296.
- (50) Romano, A.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Bircher, A.; Aberer, W.; Brockow, K.; Pichler, W. J.; Demoly, P. Diagnosis of Nonimmediate Reactions to Beta-Lactam Antibiotics. *Allergy* **2004**, *59* (11), 1153–1160.
- (51) Blanca, M.; Romano, A.; Torres, M. J.; Fernández, J.; Mayorga, C.; Rodriguez, J.; Demoly, P.; Bousquet, P. J.; Merk, H. F.; Sanz, M. L.; Ott, H.; Atanasković-Marković, M. Update on the Evaluation of Hypersensitivity Reactions to Betalactams. *Allergy* **2009**, *64* (2), 183–193.
- (52) Agache, I.; Bilò, M.; Braunstahl, G.-J.; Delgado, L.; Demoly, P.; Eigenmann, P.; Gevaert, P.; Gomes, E.; Hellings, P.; Horak, F.; Muraro, A.; Werfel, T.; Jutel, M. In Vivo Diagnosis of Allergic Diseases-Allergen Provocation Tests. *Allergy* **2015**, *70* (4), 355–365.
- (53) Nagao-Dias, A. T.; Teixeira, F. M.; Coelho, H. L. L. Diagnosing Immune-Mediated Reactions to Drugs. *Allergol. Immunopathol.* **2009**, *37* (2), 98–104.
- (54) Torres, M. J.; Blanca, M.; Fernandez, J.; Romano, A.; De Weck, A.; Aberer, W.; Brockow, K.; Pichler, W. J.; Demoly, P. Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to Beta-Lactam Antibiotics. *Allergy* **2003**, *58* (10), 961–972.
- (55) Fontaine, C.; Mayorga, C.; Bousquet, P. J.; Arnoux, B.; Torres, M. J.; Blanca, M.; Demoly, P. Relevance of the Determination of Serum-Specific IgE Antibodies in the Diagnosis of Immediate Beta-Lactam Allergy. *Allergy* **2007**, *62* (1), 47–52.
- (56) Fernández, T. D.; Torres, M. J.; Blanca-López, N.; Rodríguez-Bada, J. L.; Gomez, E.; Canto, G.; Mayorga, C.; Blanca, M. Negativization Rates of IgE Radioimmunoassay and Basophil Activation Test in Immediate Reactions to Penicillins. *Allergy* **2009**, *64* (2), 242–248.
- (57) Sanz, M. L.; Gamboa, P. M.; Antépara, I.; Uasuf, C.; Vila, L.; Garcia-Aviles, C.; Chazot, M.; De Weck, A. L. Flow Cytometric Basophil Activation Test by Detection of CD63 Expression in Patients with Immediate-Type Reactions to Betalactam Antibiotics. *Clin. Exp. All.* **2002**, *32* (2), 277–286.
- (58) Torres, M. J.; Padial, A.; Mayorga, C.; Fernández, T.; Sanchez-Sabate, E.; Cornejo-García, J. A.; Antúnez, C.; Blanca, M. The Diagnostic Interpretation of Basophil Activation Test in Immediate Allergic Reactions to Betalactams. *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34* (11), 1768–1775.
- (59) Lebel, B.; Messaad, D.; Kvedariene, V.; Rongier, M.; Bousquet, J.; Demoly, P. Cysteinyl-Leukotriene Release Test (CAST) in the Diagnosis of Immediate Drug Reactions. *Allergy* **2001**, *56* (7), 688–692.
- (60) De Weck, A. L.; Sanz, M. L. Cellular Allergen Stimulation Test (CAST) 2003 , a Review. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **2004**, *14* (4), 253–273.
- (61) Beeler, A.; Engler, O.; Gerber, B. O.; Pichler, W. J. Long-Lasting Reactivity and High Frequency of Drug-Specific T Cells after Severe Systemic Drug Hypersensitivity Reactions. *J. Allergy Clin. Immun.* **2006**, *117* (2), 455–462.

- (62) Brander, C.; Pichler, W. J.; Corradin, G. Identification of HIV Protein-Derived Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Epitopes for Their Possible Use as Synthetic Vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* **1995**, *101* (1), 107–113.
- (63) Mauri-Hellweg, D.; Zanni, M.; Frei, E.; Bettens, F.; Brander, C.; Mauri, D.; Padovan, E.; Weltzien, H. U.; Pichler, W. J. Cross-Reactivity of Cell Lines and Clones to Beta-Lactam Antibiotics. *J. Immunol.* **1996**, *157* (3), 1071–1079.
- (64) Padovan, E.; Bauer, T.; Tongio, M. M.; Kalbacher, H.; Weltzien, H. U. Penicilloyl Peptides Are Recognized as T Cell Antigenic Determinants in Penicillin Allergy. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27* (6), 1303–1307.
- (65) Padovan, E.; Pichler, W. J.; Weltzien, H. U. Antigen-Dependent and -Independent IFN-Gamma Modulation by Penicillins. *J. Immunol.* **1999**, *162* (2), 1171–1177.
- (66) Pichler, W. J.; Tilch, J. The Lymphocyte Transformation Test in the Diagnosis of Drug Hypersensitivity. *Allergy* **2004**, *59* (8), 809–820.
- (67) Farrell, J.; Naisbitt, D. J.; Drummond, N. S.; Depta, J. P. H.; Vilar, F. J.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Characterization of Sulfamethoxazole and Sulfamethoxazole Metabolite-Specific T-Cell Responses in Animals and Humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306* (1), 229–237.
- (68) Yusin, J. S.; Klaustermeyer, W.; Simmons, C. W.; Baum, M. Desensitization in Patients with Beta-Lactam Drug Allergy. *Allergol. Immunopathol.* **2013**, *41* (5), 298–303.
- (69) Bigby, M.; Jick, S.; Jick, H.; Arndt, K. Drug-Induced Cutaneous Reactions. A Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 Consecutive Inpatients, 1975 to 1982. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **1986**, *256* (24), 3358–3363.
- (70) Doña, I.; Blanca-López, N.; Torres, M. J.; Garcia-Campos, J.; Garcia-Nuñez, I.; Gómez, F.; Salas, M.; Rondón, C.; Canto, M. G.; Blanca, M. Drug Hypersensitivity Reactions: Response Patterns, Drug Involved, and Temporal Variations in a Large Series of Patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2012**, *22* (5), 363–371.
- (71) ANSM. *L'évolution Des Consommations D'antibiotiques En France Entre 2000 et 2013; 2014*; pp 1–35.
- (72) Duchesne, E. Contribution À L'étude de La Concurrence Vitale Chez Les Microorganismes: Antagonisme Entre Les Microbes et Les Moisissures., Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, 1897, Vol. 1898, pp 1–56.
- (73) Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B.influenzae. *Brit. J. Exp. Path.* **1929**, *10* (3), 226–236.
- (74) Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. G. Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *Lancet* **1940**, *236* (6104), 226–228.
- (75) Abraham, E. P.; Chain, E.; Fletcher, C. M.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A. Further Observations on Penicillin. *Lancet* **1941**, *238* (6155), 177–188.
- (76) Bentley, R. Different Roads to Discovery; Prontosil (hence Sulfa Drugs) and Penicillin (hence Beta-Lactams). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36* (6), 775–786.
- (77) Sheehan, J. C.; Henery-Logan, K. R.; Johnson, D. A. The Synthesis of Substitued Penicillins and Simpler Structural Analogs. VII. The Cyclisation of a Penicilloate Derivative to Methyl Phthalimidopenicillanate. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (13), 3292–3293.

- (78) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (4), 1067–1068.
- (79) Sheehan, J. C.; Henery-Logan, K. R. The Total Synthesis of Penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (5), 1262–1263.
- (80) Sheehan, J. C.; Henery-Logan, K. R. The Total Synthesis of Penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (12), 3089–3094.
- (81) Bellgardt, K. Beta-Lactam Antibiotics Production with *Penicillium Chrysogenum* and *Acremonium Chrysogenum*. In *Bioreaction Engineering*; Schügerl, K., Bellgardt, K.-H., Eds.; Berlin, 2000; pp 391–432.
- (82) Moyer, A. Method for Production of Penicillin. US2442141A, 1948.
- (83) Moyer, A. Method for Production of Penicillin. US2443989A, 1948.
- (84) Foster, J. W.; McDaniel, L. E. Process for the Production of Penicillin. US2448790A, 1948.
- (85) Foster, J. W.; McDaniel, L. E. Production of Penicillin in Cotton-Seed Meal Medium. US2448791A, 1948.
- (86) Moyer, A. J. Method for Production of Penicillin. US2476107A, 1949.
- (87) Demain, A. L.; Somerson, N. L. Process for the Production of Penicillin. US3024169A, 1962.
- (88) Elander, R. P. Industrial Production of Beta-Lactam Antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61* (5-6), 385–392.
- (89) Behrens, O. K.; Corse, J.; Jones, R. G.; Mann, M. J.; Soper, Q. F.; Van Abeele, F. R.; Chiang, M.-C. Biosynthesis of Penicillins. I. Biological Precursors for Benzylpenicillin (penicillin G). *J. Biol. Chem.* **1948**, *175* (2), 751–764.
- (90) Queener, S. W. Molecular Biology of Penicillin and Cephalosporin Biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34* (6), 943–948.
- (91) Mann, J. Survival of the Fittest. *Educ. Chem.* **2009**, *46* (4).
- (92) Kong, K.-F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS* **2010**, *118* (1), 1–36.
- (93) Tipper, D. J.; Strominger, J. L. Mechanism of Action of Penicillins: A Proposal Based on Their Structural Similarity to Acyl-D-Alanyl-D-Alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1965**, *54* (4), 1133–1141.
- (94) Frère, J.-M.; Joris, B. Penicillin-Sensitive Enzymes in Peptidoglycan Biosynthesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **1985**, *11* (4), 299–396.
- (95) Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundstrom, T. The Acyl-Enzyme Mechanism of Beta-Lactamase Action. *Biochem. J.* **1982**, *207* (2), 315–322.
- (96) stl-bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.html consulté en 2014.
- (97) Levine, B. B.; Ovary, Z. Studies on the Mechanism of the Formation of the Penicillin Antigen. III. The N-(D-Alpha-Benzylpenicilloyl) Group as an Antigenic Determinant Responsible for Hypersensitivity to Penicillin G. *J. Exp. Med.* **1961**, *114*, 875–904.

- (98) Schneider, C. H.; De Weck, A. L. A New Chemical Aspect of Penicillin Allergy: The Direct Reaction of Penicillin with Epsilon-Amino-Groups. *Nature* **1965**, *208* (5005), 57–59.
- (99) Batchelor, F. R.; Dewdney, J. M.; Gazzard, D. Penicillin Allergy: The Formation of the Penicilloyl Determinant. *Nature* **1965**, *206* (982), 362–364.
- (100) Yvon, M.; Wal, J. M. Identification of Lysine Residue 199 of Human Serum Albumin as a Binding Site for Benzylpenicilloyl Groups. *FEBS Lett.* **1988**, *239* (2), 237–240.
- (101) Yvon, M.; Anglade, P.; Wal, J. M. Binding of Benzyl Penicilloyl to Human Serum Albumin. Evidence for a Highly Reactive Region at the Junction of Domains 1 and 2 of the Albumin Molecule. *FEBS Lett.* **1989**, *247* (2), 273–278.
- (102) Yvon, M.; Anglade, P.; Wal, J. M. Identification of the Binding Sites of Benzyl Penicilloyl, the Allergic Metabolite of Penicillin, on the Serum Albumin Molecule. *FEBS Lett.* **1990**, *263* (2), 237–240.
- (103) Meng, X.; Jenkins, R. E.; Berry, N. G.; Maggs, J. L.; Farrell, J.; Lane, C. S.; Stachulski, A. V.; French, N. S.; Naisbitt, D. J.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Direct Evidence for the Formation of Diastereoisomeric Benzylpenicilloyl Haptens from Benzylpenicillin and Benzylpenicillenic Acid in Patients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *338* (3), 841–849.
- (104) Levine, B. B. Studies on the Formation of the Penicillin Acid Antigen . II . Some Reactions of D-Benzylpenicillenic in Aqueous Solution at pH 7.5. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *93*, 50–55.
- (105) Levine, B. B. Formation of D-Penicillamine-Cysteine Mixed Disulphide by Reaction of D-Benzylpenicilloic Acid with Cysteine. *Nature* **1960**, *187* (4741), 940–941.
- (106) Schwartz, M. A. Mechanism of Degradation of Penicillin G in Acidic Solution. *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54* (3), 472–473.
- (107) Jensen, K. A.; Moller, K.; Overgaard, K. Studies on the Excretion of Penicillin through the Kidneys and the Mechanism of This Process. *Acta Pharmacol.* **1945**, *1* (2), 184–206.
- (108) Tamai, I.; Tsuji, A. Kinetics of Benzylpenicillin Metabolism in Isolated Rat Hepatocytes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1987**, *40* (4), 533–541.
- (109) Batchelor, F. R.; Doyle, F. P.; Nayler, J. H. C.; Rolinson, G. N. Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations. *Nature* **1959**, *183* (4656), 257–258.
- (110) Sherlock, R. New Penicillins. GB1057028, 1967.
- (111) Nayler, J. H. C.; Smith, H. Penicillins. US3192198A, 1965.
- (112) Rolinson, G. N.; Batchelor, F. R.; Butterworth, D.; Cameron-Wood, J.; Cole, M.; Eustace, G. C.; Hart, M. V.; Richards, M.; Chain, E. B. Formation of a 6-Aminopenicillanic Acid from Penicillin by Enzymatic Hydrolysis. *Nature* **1960**, *187* (4733), 236–237.
- (113) Claridge, C. A.; Gourevitch, A.; Lein, J. Bacterial Penicillin Amidase. *Nature* **1960**, *187* (4733), 237–238.
- (114) Huang, H. T.; English, A. R.; Seto, T. A.; Shull, G. M.; Sobin, B. A. Enzymatic Hydrolysis of the Side Chain of Penicillins. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (14), 3790–3791.
- (115) Weissenburger, H. W. O.; Van der Hoeven, M. G. An Efficient Nonenzymatic Conversion of Benzyl-Penicillin to 6-Aminopenicillanic Acid. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **1970**, *89* (10), 1081–1084.

- (116) Matsumoto, K. Production of 6-APA, 7-ACA, and 7-ADCA by Immobilized Penicillin and Cephalosporin Amidases. In *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*; Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T., Eds.; Dekker: New York, 1993; pp 67–88.
- (117) Parmar, A.; Kumar, H.; Marwaha, S. S.; Kennedy, J. F. Advances in Enzymatic Transformation of Penicillins to 6-Aminopenicillanic Acid (6-APA). *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18* (4), 289–301.
- (118) Marconi, W.; Cecere, F.; Morisi, F.; Della Penna, G.; Rappuoli, B. The Hydrolysis of Penicillin G to 6-Amino Penicillanic Acid by Entrapped Penicillin Acylase. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1973**, *26* (4), 228–232.
- (119) Bruggink, A.; Roos, E. C.; De Vroom, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of Beta-Lactam Antibiotics. *Org. Process Res. Dev.* **1998**, *2* (2), 128–133.
- (120) Love, D. A. Penicillin Synthesis. GB1339605A, 1971.
- (121) Van der Drift, J. K.; Henniger, P. W.; Van Veen, G. J. 6-(D-Alpha-Amino-Para-Hydroxy-Phenylacetamido)-Penicillanic Acid Preparation. US4128547A, 1978.
- (122) Marconi, W.; Bartoli, F.; Cecere, F.; Galli, G.; Morisi, F. Synthesis of Penicillins and Cephalosporins by Penicillin Acylase Entrapped in Fibres. *Agr. Biol. Chem.* **1975**, *39* (1), 277–279.
- (123) Clausen, K.; Dekkers, R. M. Process for Preparation of Beta-Lactams at Constantly High Concentration of Reactants. WO9602663A1, 1996.
- (124) Alemzadeh, I.; Borghei, G.; Va, L.; Roostaazad, R. Enzymatic Synthesis of Amoxicillin with Immobilized Penicillin G Acylase. *Trans. C Chem. Chem. Eng.* **2010**, *17* (1), 106–113.
- (125) Wu, Q.; Chen, C.-X.; Du, L.-L.; Lin, X.-F. Enzymatic Synthesis of Amoxicillin via a One-Pot Enzymatic Hydrolysis and Condensation Cascade Process in the Presence of Organic Co-Solvents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160* (7), 2026–2035.
- (126) Magi, B.; Marzocchi, B.; Bini, L.; Cellesi, C.; Rossolini, A.; Pallini, V. Two-Dimensional Electrophoresis of Human Serum Proteins Modified by Ampicillin during Therapeutic Treatment. *Electrophoresis* **1995**, *16* (7), 1190–1192.
- (127) Jenkins, R. E.; Meng, X.; Elliott, V. L.; Kitteringham, N. R.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Characterisation of Flucloxacillin and 5-Hydroxymethyl Flucloxacillin Haptenated HSA in Vitro and in Vivo. *Proteomics. Clin. Appl.* **2009**, *3* (6), 720–729.
- (128) Whitaker, P.; Meng, X.; Lavergne, S. N.; El-Ghaiesh, S.; Monshi, M.; Earnshaw, C.; Peckham, D.; Gooi, J.; Conway, S.; Pirmohamed, M.; Jenkins, R. E.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K. Mass Spectrometric Characterization of Circulating and Functional Antigens Derived from Piperacillin in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Immunol.* **2011**, *187* (1), 200–211.
- (129) Ariza, A.; Garzon, D.; Abánades, D. R.; de los Ríos, V.; Vistoli, G.; Torres, M. J.; Carini, M.; Aldini, G.; Pérez-Sala, D. Protein Haptenation by Amoxicillin: High Resolution Mass Spectrometry Analysis and Identification of Target Proteins in Serum. *J. Proteomics* **2012**, *77*, 504–520.
- (130) Hitchings, G. H. Session I. Laboratory Aspects; Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole-I. *J. Infect. Dis.* **1973**, *128* (Suppl. 3), S433–S436.
- (131) Shionogi and Co LTD. 3-Sulphanilamido-5-Methylisoxazole and a Process for Its Preparation. GB814276A, 1957.

- (132) Burchall, J. J. Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole II. *J. Infect. Dis.* **1973**, 128 (Suppl. 3), S437–S441.
- (133) Sanderson, J. P.; Naisbitt, D. J.; Farrell, J.; Ashby, C. A.; Tucker, M. J.; Rieder, M. J.; Pirmohamed, M.; Clarke, S. E.; Park, B. K. Sulfamethoxazole and Its Metabolite Nitroso Sulfamethoxazole Stimulate Dendritic Cell Costimulatory Signaling. *J. Immunol.* **2007**, 178 (9), 5533–5542.
- (134) Cribb, A. E.; Miller, M.; Tesoro, A.; Spielberg, S. P. Peroxidase-Dependent Oxidation of Sulfonamides by Monocytes and Neutrophils From Humans and Dogs. *Mol. Pharmacology* **1990**, 38 (5), 744–751.
- (135) Callan, H. E.; Jenkins, R. E.; Maggs, J. L.; Lavergne, S. N.; Clarke, S. E.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K. Multiple Adduction Reactions of Nitroso Sulfamethoxazole with Cysteiny Residues of Peptides and Proteins: Implications for Hapten Formation. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22 (5), 937–948.
- (136) Naisbitt, D. J.; Gordon, S. F.; Pirmohamed, M.; Burkhart, C.; Cribb, A. E.; Pichler, W. J.; Park, B. K. Antigenicity and Immunogenicity of Sulphamethoxazole: Demonstration of Metabolism-Dependent Haptenation and T-Cell Proliferation in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 133 (2), 295–305.
- (137) Manchanda, T.; Hess, D.; Dale, L.; Ferguson, S. G.; Rieder, M. J. Haptenation of Sulfonamide Reactive Metabolites to Cellular Proteins. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 62 (5), 1011–1026.
- (138) Peng, L.; Dasari, S.; Tabb, D. L.; Turesky, R. J. Mapping Serum Albumin Adducts of the Food-Borne Carcinogen 2-Amino-1-Methyl-6-phenylimidazo[4,5- B]pyridine by Data-Dependent Tandem Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25 (10), 2179–2193.
- (139) Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Human Serum Albumin: From Bench to Bedside. *Mol. Aspects Med.* **2012**, 33 (3), 209–290.
- (140) Wang, Y.; Yu, H.; Shi, X.; Luo, Z.; Lin, D.; Huang, M. Structural Mechanism of Ring-Opening Reaction of Glucose by Human Serum Albumin. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288 (22), 15980–15987.
- (141) Aleksic, M.; Pease, C. K.; Basketter, D. A.; Panico, M.; Morris, H. R.; Dell, A. Investigating Protein Haptenation Mechanisms of Skin Sensitisers Using Human Serum Albumin as a Model Protein. *Toxicol. Vitro.* **2007**, 21 (4), 723–733.
- (142) Joos, R. W.; Hall, W. H. Determination of Binding Constants of Serum Albumin for Penicillin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1969**, 166 (1), 113–118.
- (143) Wal, J.-M.; Bories, G.; Mamas, S.; Dray, F. Radioimmunoassay of Penicilloyl Groups in Biological Fluids. *FEBS Lett.* **1975**, 57 (1), 9–13.
- (144) El-Ghaiesh, S.; Monshi, M. M.; Whitaker, P.; Jenkins, R.; Meng, X.; Farrell, J.; Elsheikh, A.; Peckham, D.; French, N.; Pirmohamed, M.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. Characterization of the Antigen Specificity of T-Cell Clones from Piperacillin-Hypersensitive Patients with Cystic Fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, 341 (3), 597–610.
- (145) Lafaye, P.; Lapresle, C. Location of Penicilloyl Groups on CNBr Fragments of the Albumin from Penicillin-Treated Patients. *FEBS Lett.* **1987**, 220 (1), 206–208.
- (146) Inglis, A. S.; Edman, P. Mechanism of Cyanogen Bromide Reaction with Methionine in Peptides and Proteins. *Anal. Biochem.* **1970**, 37 (1), 73–80.

- (147) Kasper, C. B. Fragmentation of Proteins for Sequence Studies and Separation of Peptide Mixtures. In *Protein Sequence Determination - Vol. 8 of the series Molecular Biology Biochemistry and Biophysics*; Needleman, S. B., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 1975; pp 114–161.
- (148) Lafaye, P.; Lapresle, C. Identification of Two Fixation Sites for Penicilloyl Groups on the Albumin Molecule from Penicillin-Treated Patients. *FEBS Lett.* **1988**, *234* (2), 305–308.
- (149) Arvan, D. A.; Blumberg, B. S.; Melartin, L. Transient “bisalbuminemia” Induced by Drugs. *Clin. Chim. Acta* **1968**, *22* (2), 211–218.
- (150) Lapresle, C.; Wal, J.-M. The Binding of Penicillin to Albumin Molecules in Bisalbuminemia Induced by Penicillin Therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *586* (1), 106–111.
- (151) Yamana, T.; Tsuji, A.; Miyamoto, E.; Kiya, E. The Reaction of Benzylpenicillin with Amines Containing Hydroxyl Groups. *J. Pharm. Pharmacol.* **1975**, *27* (10), 771–774.
- (152) Liu, X.; Song, D.; Zhang, Q.; Tian, Y.; Liu, Z.; Zhang, H. Characterization of Drug-Binding Levels to Serum Albumin Using a Wavelength Modulation Surface Plasmon Resonance Sensor. *Sensors Actuators B Chem.* **2006**, *117* (1), 188–195.
- (153) Bird, A. E.; Marshall, A. C. Correlation of Serum Binding of Penicillins with Partition Coefficients. *Biochem. Pharmacol.* **1967**, *16* (12), 2275–2290.
- (154) Terasaki, T.; Nouda, H.; Tsuji, A. Relationship between Lipophilicity and Binding Affinity with Human Serum Albumin for Penicillin and Cephem Antibiotics. *J. Pharmacobio-Dyn.* **1992**, *15* (3), 99–106.
- (155) Llinás, A.; Page, M. I. Intramolecular General Acid Catalysis in the Aminolysis of Beta-Lactam Antibiotics. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (5), 651–654.
- (156) Aldini, G.; Gamberoni, L.; Orioli, M.; Beretta, G.; Regazzoni, L.; Facino, R. M.; Carini, M. Mass Spectrometric Characterization of Covalent Modification of Human Serum Albumin by 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41* (9), 1149–1161.
- (157) Meekins, C. V.; Sullivan, T. J.; Gruchalla, R. S. Immunochemical Analysis of Sulfonamide Allergy: Identification of Sulfamethoxazole-Substituted Human Serum Proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1994**, *94* (6), 1017–1024.
- (158) Cribb, A. E.; Miller, M.; Leeder, J. S.; Hill, J.; Spielberg, S. P. Reactions of the Nitroso and Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole with Reduced Glutathione. Implications for Idiosyncratic Toxicity. *Drug Metab. Dispos.* **1991**, *19* (5), 900–906.
- (159) Naisbitt, D. J.; Neill, P. M. O.; Pirmohamed, M.; Park, K. B. Synthesis and Reactions of Nitroso Sulphamethoxazole with Biological Nucleophiles: Implications for Immune Mediated Toxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (13), 1511–1516.
- (160) Benesch, R.; Benesch, R. E. Thiolation of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44* (9), 848–853.
- (161) Naisbitt, D. J.; Farrell, J.; Gordon, S. F.; Maggs, J. L.; Burkhart, C.; Pichler, W. J.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Covalent Binding of the Nitroso Metabolite of Sulfamethoxazole Leads to Toxicity and Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Presentation. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62* (3), 628–637.

- (162) Cheng, L.; Stewart, B. J.; You, Q.; Petersen, D. R.; Ware, J. A.; Piccotti, J. R.; Kawabata, T. T.; Ju, C. Covalent Binding of the Nitroso Metabolite of Sulfamethoxazole Is Important in Induction of Drug-Specific T-Cell Responses in Vivo. *Mol. Pharm.* **2008**, *73* (6), 1769–1775.
- (163) Peng, L.; Turesky, R. J. Capturing Labile Sulfenamide and Sulfinamide Serum Albumin Adducts of Carcinogenic Arylamines by Chemical Oxidation. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (2), 1065–1072.
- (164) Hennecke, J.; Wiley, D. C. Structure of a Complex of the Human Alpha/beta T Cell Receptor (TCR) HA1.7, Influenza Hemagglutinin Peptide, and Major Histocompatibility Complex Class II Molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): Insight into TCR Cross-Restriction and Alloreactivity. *J. Exp. Med.* **2002**, *195* (5), 571–581.
- (165) Klein, J.; Sato, A. The HLA System - First of Two Parts. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343* (10), 702–709.
- (166) Bera, O.; Cesaire, R.; Quelvennec, E.; Quillivic, F.; de Chavigny, V.; Ribal, C.; Semana, G. HLA Class I and Class II Allele and Haplotype Diversity in Martinicans. *Tissue Antigens* **2001**, *57* (3), 200–207.
- (167) Colombani, J. *HLA : Fonctions Immunitaires et Applications Médicales*; John Libbey Eurotext, Ed.; Paris, 1993; p 82.
- (168) Hmida, S.; Gauthier, A.; Dridi, A.; Quillivic, E.; Genetet, B.; Boukef, K.; Semana, G. HLA Class II Gene Polymorphism in Tunisians. *Tissue Antigens* **1995**, *45* (1), 63–68.
- (169) Raguénès, O.; Mercier, B.; Clèdes, J.; Whebe, B.; Férec, C. HLA Class II Typing and Idiopathic IgA Nephropathy (IgAN): DQB1*0301, a Possible Marker of Unfavorable Outcome. *Tissue Antigens* **1995**, *45* (4), 246–249.
- (170) Dubois, V. (laboratoire HLA de Lyon) Résultats Non Publiés, Source [Http://www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) (référence Ci-Dessous) Consulté En Mars 2015.
- (171) González-Galarza, F. F.; Takeshita, L. Y. C.; Santos, E. J. M.; Kempson, F.; Maia, M. H. T.; Silva, A. L. S. Da; Silva, A. L. T. E.; Ghataoraya, G. S.; Alfirevic, A.; Jones, A. R.; Middleton, D. Allele Frequency Net 2015 Update: New Features for HLA Epitopes, KIR and Disease and HLA Adverse Drug Reaction Associations. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (10), 1–5.
- (172) Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Urban, R. G.; Strominger, J. L.; Wiley, D. C. Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature* **1993**, *364* (6432), 33–39.
- (173) Rammensee, H.-G. Chemistry of Peptides Associated with MHC Class I and Class II Molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **1995**, *7* (1), 85–96.
- (174) Stern, L. J.; Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Urban, R. G.; Strominger, J. L.; Wiley, D. C. Crystal Structure of the Human Class II MHC Protein HLA-DR1 Complexed with an Influenza Virus Peptide. *Nature* **1994**, *368* (6468), 215–221.
- (175) Grohmann, U.; Belladonna, M. L.; Bianchi, R.; Orabona, C.; Silla, S.; Squillacioti, G.; Fioretti, M. C.; Puccetti, P. Immunogenicity of Tumor Peptides: Importance of Peptide Length and Stability of peptide/MHC Class II Complex. *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, *48* (4), 195–203.
- (176) Bernardeau, K.; Kerzhero, J.; Fortun, A.; Moreau-Aubry, A.; Favry, E.; Echasserieau, K.; Tartour, E.; Maillère, B.; Lang, F. A Simple Competitive Assay to Determine Peptide Affinity for HLA Class II Molecules: A Useful Tool for Epitope Prediction. *J. Immunol. Methods* **2011**, *371* (1-2), 97–105.

- (177) Mathieu, M. G.; Knights, A. J.; Pawelec, G.; Riley, C. L.; Wernet, D.; Lemonnier, F. A.; Straten, P. T.; Mueller, L.; Rees, R. C.; McArdle, S. E. B. HAGE, a Cancer/testis Antigen with Potential for Melanoma Immunotherapy: Identification of Several MHC Class I/II HAGE-Derived Immunogenic Peptides. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56* (12), 1885–1895.
- (178) Homan, E. J.; Bremel, R. D. Patterns of Predicted T-Cell Epitopes Associated with Antigenic Drift in Influenza H3N2 Hemagglutinin. *PLoS One* **2011**, *6* (10), e26711.
- (179) Chicz, R. M.; Urban, R. G.; Lane, W. S.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Vignali, D. A. A.; Strominger, J. L. Predominant Naturally Processed Peptides Bound to HLA-DR1 Are Derived from MHC-Related Molecules and Are Heterogeneous in Size. *Nature* **1992**, *358* (6389), 764–768.
- (180) Vita, R.; Overton, J. A.; Greenbaum, J. A.; Ponomarenko, J.; Clark, J. D.; Cantrell, J. R.; Wheeler, D. K.; Gabbard, J. L.; Hix, D.; Sette, A.; Peters, B. The Immune Epitope Database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (D1), D405–D412.
- (181) Vita, R.; Zarebski, L.; Greenbaum, J. A.; Emami, H.; Hoof, I.; Salimi, N.; Damle, R.; Sette, A.; Peters, B. The Immune Epitope Database 2.0. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (Database issue), D854–D862.
- (182) Sette, A.; Fleri, W.; Peters, B.; Sathiamurthy, M.; Bui, H.-H.; Wilson, S. A Roadmap for the Immunomics of Category A–C Pathogens. *Immunity* **2005**, *22* (2), 155–161.
- (183) Rammensee, H.-G.; Bachmann, J.; Emmerich, N. P. N.; Bachor, O. A.; Stevanovic, S. SYFPEITHI: Database for MHC Ligands and Peptide Motifs. *Immunogenetics* **1999**, *50* (3-4), 213–219.
- (184) Bhasin, M.; Singh, H.; Raghava, G. P. S. MHCBN: A Comprehensive Database of MHC Binding and Non-Binding Peptides. *Bioinformatics* **2003**, *19* (5), 665–666.
- (185) Toseland, C. P.; Clayton, D. J.; McSparron, H.; Hemsley, S. L.; Blythe, M. J.; Paine, K.; Doytchinova, I. A.; Guan, P.; Hattotuwigama, C. K.; Flower, D. R. AntiJen: A Quantitative Immunology Database Integrating Functional, Thermodynamic, Kinetic, Biophysical, and Cellular Data. *Immunome Res.* **2005**, *1* (1), 4.
- (186) Nielsen, M.; Lund, O.; Buus, S.; Lundegaard, C. MHC Class II Epitope Predictive Algorithms. *Immunology* **2010**, *130* (3), 319–328.
- (187) Peters, B.; Bui, H.-H.; Frankild, S.; Nielson, M.; Lundegaard, C.; Kostem, E.; Basch, D.; Lamberth, K.; Harndahl, M.; Fleri, W.; Wilson, S. S.; Sidney, J.; Lund, O.; Buus, S.; Sette, A. A Community Resource Benchmarking Predictions of Peptide Binding to MHC-I Molecules. *PLoS Comput. Biol.* **2006**, *2* (6), e65.
- (188) Peters, B.; Sette, A. Integrating Epitope Data into the Emerging Web of Biomedical Knowledge Resources. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (6), 485–490.
- (189) Peters, B.; Sidney, J.; Bourne, P.; Bui, H.-H.; Buus, S.; Doh, G.; Fleri, W.; Kronenberg, M.; Kubo, R.; Lund, O.; Nemazee, D.; Ponomarenko, J. V.; Sathiamurthy, M.; Schoenberger, S.; Stewart, S.; Surko, P.; Way, S.; Wilson, S.; Sette, A. The Immune Epitope Database and Analysis Resource: From Vision to Blueprint. *PLoS Biol.* **2005**, *3* (3), e91.
- (190) Wang, P.; Sidney, J.; Dow, C.; Mothé, B.; Sette, A.; Peters, B. A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach. *PLoS Comput. Biol.* **2008**, *4* (4), e1000048.
- (191) Wang, P.; Sidney, J.; Kim, Y.; Sette, A.; Lund, O.; Nielsen, M.; Peters, B. Peptide Binding Predictions for HLA DR, DP and DQ Molecules. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 568.

- (192) Chang, S. T.; Ghosh, D.; Kirschner, D. E.; Linderman, J. J. Peptide Length-Based Prediction of Peptide-MHC Class II Binding. *Bioinformatics* **2006**, *22* (22), 2761–2767.
- (193) Nielsen, M.; Lund, O. NN-Align. An Artificial Neural Network-Based Alignment Algorithm for MHC Class II Peptide Binding Prediction. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10* (1), 296.
- (194) Nikiforovich, G. V; Marshall, G. R. Computational Approaches in Peptide and Protein Design: An Overview. In *Peptide and Protein Design for Biopharmaceutical Applications*; Jensen, K. J., Ed.; John Wiley and sons, ltd.: Chichester, 2009; pp 5–48.
- (195) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33–38.
- (196) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935.
- (197) Bouard, C.; Terreux, R.; Hope, J.; Chemelle, J. A.; Puisieux, A.; Ansieau, S.; Payen, L. Interhelical Loops within the bHLH Domain Are Determinant in Maintaining TWIST1-DNA Complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2014**, *32* (2), 226–241.
- (198) Kortemme, T.; Baker, D. A Simple Physical Model for Binding Energy Hot Spots in Protein-Protein Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (22), 14116–14121.
- (199) Kortemme, T.; Kim, D. E.; Baker, D. Computational Alanine Scanning of Protein-Protein Interfaces. *Sci. STKE* **2004**, *2004* (219), pl2.
- (200) Kim, D. E.; Chivian, D.; Baker, D. Protein Structure Prediction and Analysis Using the Robetta Server. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (Web Server issue), W526–W531.
- (201) Jenkinson, C.; Jenkins, R. E.; Maggs, J. L.; Kitteringham, N. R.; Aleksic, M.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. A Mechanistic Investigation into the Irreversible Protein Binding and Antigenicity of Para-Phenylenediamine. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22* (6), 1172–1180.
- (202) Peng, L.; Turesky, R. J. Mass Spectrometric Characterization of 2-Amino-1-Methyl-6-phenylimidazo[4,5-B]pyridine N-Oxidized Metabolites Bound at Cys34 of Human Serum Albumin. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24* (11), 2004–2017.
- (203) Boto Castro, A.; Hernandez Gonzalez, R.; Saavedra Fernandez, C.; Alvarez Gonzalez, E. Chemical Process for the Selective Modification of Peptides. WO2013/001120A1, 2013.
- (204) Hennrich, M. L.; Boersema, P. J.; van den Toorn, H.; Mischerikow, N.; Heck, A. J. R.; Mohammed, S. Effect of Chemical Modifications on Peptide Fragmentation Behavior upon Electron Transfer Induced Dissociation. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (18), 7814–7822.
- (205) Wiese, S.; Reidegeld, K. A.; Meyer, H. E.; Warscheid, B. Protein Labeling by iTRAQ: A New Tool for Quantitative Mass Spectrometry in Proteome Research. *Proteomics* **2007**, *7* (3), 340–350.
- (206) Wiktorowicz, J. E.; English, R. D.; Wu, Z.; Kurosky, A. Model Studies on iTRAQ Modification of Peptides: Sequence-Dependent Reaction Specificity. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (3), 1512–1520.
- (207) Edwards, J. V.; Prevost, N.; Sethumadhavan, K.; Ullah, A.; Condon, B. Peptide Conjugated Cellulose Nanocrystals with Sensitive Human Neutrophil Elastase Sensor Activity. *Cellulose* **2013**, *20* (3), 1223–1235.

- (208) Boto, A.; Gallardo, J. A.; Hernández, R.; Ledo, F.; Muñoz, A.; Murguía, J. R.; Menacho-Márquez, M.; Orjales, A.; Saavedra, C. J. Genotoxic Activity of Halogenated Phenylglycine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (23), 6073–6077.
- (209) Fields, G. B.; Fields, C. G.; Petefish, J.; van Wart, H. E.; Cross, T. A. Solid-Phase Peptide Synthesis and Solid-State NMR Spectroscopy of [Ala³-¹⁵N][Val¹]gramicidin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85* (5), 1384–1388.
- (210) Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. Solid-Phase Synthesis of Neurokinin A Antagonists. Comparison of the Boc and Fmoc Methods. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37* (2), 140–144.
- (211) Atherton, E.; Caviezel, M.; Fox, H.; Harkiss, D.; Over, H.; Sheppard, R. C. Peptide Synthesis. Part 3. Comparative Solid-Phase Syntheses of Human Beta-Endorphin on Polyamide Supports Using Tert-Butoxycarbonyl and Fluorenylmethoxycarbonyl Protecting Groups. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, 65–73.
- (212) Gerig, J. T.; Reinheimer, J. D. Modification of Human Serum Albumin with Trifluoromethyl-Substituted Aryl Halides and Sulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* (1), 168–173.
- (213) Gerig, J. T.; Katz, K. E.; Reinheimer, J. D. Reactions of 2,6-Dinitro-4-Trifluoromethylbenzenesulfonate with Human Serum Albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *534* (2), 196–209.
- (214) Díaz, N.; Suárez, D.; Sordo, T. L.; Merz, K. M. A Theoretical Study of the Aminolysis Reaction of Lysine 199 of Human Serum Albumin with Benzylpenicillin: Consequences for Immunochemistry of Penicillins. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (31), 7574–7583.
- (215) O'Grady, F.; Lambert, H. P.; Finch, R. G.; Greenwood, D. *Antibiotics and Chemotherapy: Anti-Infective Agents and Their Use In Therapy*, 7th Ed.; Churchill Livingstone, Ed.; New York, 1997; p 987.
- (216) DiPiro, J. T.; Adkinson, N. F. J.; Hamilton, R. G. Facilitation of Penicillin Haptenation to Serum Proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37* (7), 1463–1467.
- (217) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. *Protein Eng.* **1999**, *12* (6), 439–446.
- (218) Sturniolo, T.; Bono, E.; Ding, J.; Radrizzani, L.; Tuereci, O.; Sahin, U.; Braxenthaler, M.; Gallazzi, F.; Protti, M. P.; Sinigaglia, F.; Hammer, J. Generation of Tissue-Specific and Promiscuous HLA Ligand Databases Using DNA Microarrays and Virtual HLA Class II Matrices. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (6), 555–561.
- (219) Jardetzky, T. S.; Brown, J. H.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Urban, R. G.; Chi, Y.; Stauffacher, C.; Strominger, J. L.; Wiley, D. Three-Dimensional Structure of a Human Class II Histocompatibility Molecule Complexed with Superantigen. *Nature* **1994**, *368* (6473), 711–718.
- (220) Günther, S.; Schlundt, A.; Sticht, J.; Roske, Y.; Heinemann, U.; Wiesmüller, K.-H.; Jung, G.; Falk, K.; Röttschke, O.; Freund, C. Bidirectional Binding of Invariant Chain Peptides to an MHC Class II Molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (51), 22219–22224.
- (221) Combet, C.; Jambon, M.; Deléage, G.; Geourjon, C. Geno3D: Automatic Comparative Molecular Modelling of Protein. *Bioinformatics* **2002**, *18* (1), 213–214.
- (222) Robinson, J.; Halliwell, J. A.; McWilliam, H.; Lopez, R.; Parham, P.; Marsh, S. G. E. The IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (Database issue), D1222–D1227.

- (223) Robinson, J.; Halliwell, J. A.; Hayhurst, J. D.; Flicek, P.; Parham, P.; Marsh, S. G. E. The IPD and IMGT/HLA Database: Allele Variant Databases. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *43* (November 2014), 423–431.
- (224) Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504.
- (225) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed.; Wiley, Ed.; Wiley: Hoboken, 2007; p 1082.
- (226) Stedman, J. R. Tert-Butyl Ester of 7-Aminocephalosporanic Acid. *J. Med. Chem.* **1966**, *9* (3), 444.
- (227) Chevallet, P.; Garrouste, P.; Malawska, B.; Martinez, J. Facile Synthesis of Tert-Butyl Ester of N-Protected Amino Acids with Tert-Butyl Bromide. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (46), 7409–7412.
- (228) Nahmany, M.; Melman, A. Facile Acylation of Sterically Hindered Alcohols through Ketene Intermediates. *Org. Lett.* **2001**, *3* (23), 3733–3735.
- (229) Chow, A. W.; Hall, N. M.; Hoover, J. R. E. Penicillin Sulfoxides and Sulfones. *J. Org. Chem.* **1962**, *27* (4), 1381–1383.
- (230) Granier, S.; Jean-Alphonse, F.; Déméné, H.; Guillon, G.; Pascal, R.; Mendre, C. Design and Synthesis of Cyclic and Linear Peptide-Agarose Tools for Baiting Interacting Protein Partners of GPCRs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (3), 521–524.
- (231) Kenner, G. W.; Seely, J. H. Phenyl Esters for C-Terminal Protection in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (9), 3259–3260.
- (232) Goodman, M.; Stueben, K. Amino Acid Active Esters. III. Base-Catalyzed Racemization of Peptide Active Esters. *J. Org. Chem.* **1962**, *27* (10), 3409–3416.
- (233) Reissmann, S.; Greiner, G. Hydrolysis of Peptide Esters by Different Enzymes. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40* (2), 110–113.
- (234) Di Gioia, M. L.; Leggio, A.; Le Pera, A.; Liguori, A.; Perri, F.; Siciliano, C. Alternative and Chemoselective Deprotection of the Alpha-Amino and Carboxy Functions of N-Fmoc-Amino Acid and N-Fmoc-Dipeptide Methyl Esters by Modulation of the Molar Ratio in the AlCl₃/N,N-Dimethylaniline Reagent System. *European J. Org. Chem.* **2004**, *2004* (21), 4437–4441.
- (235) Ohtani, M.; Watanabe, F.; Narisada, M. Mild Deprotection of Carbapenem Esters with Aluminium Trichloride. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (26), 5271–5272.
- (236) Tsuji, T.; Rataoka, T.; Yoshioka, M.; Sendo, Y.; Nishitani, Y.; Hirai, S.; Maeda, T.; Nagata, W. Synthetic Studies on Beta-Lactam Antibiotics. VII. Mild Removal of the Benzyl Ester Protecting Group with Aluminium Trichloride. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (30), 2793–2796.
- (237) Mc Murry, J. Ester Cleavages via SN₂-Type Dealkylation. In *Organic Reactions - Vol 24*; Wiley, Ed.; Wiley, 1976; pp 187–201.
- (238) Müller, P.; Siegfried, B. SN₂ Reactions with Carboxylic Esters. Selective Cleavage of Methyl Esters. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57* (4), 987–994.
- (239) Haslam, E. Recent Developments in Methods for the Esterification and Protection of the Carboxyl Group. *Tetrahedron* **1980**, *36* (17), 2409–2433.

- (240) Biron, E.; Kessler, H. Convenient Synthesis of N-Methylamino Acids Compatible with Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (13), 5183–5189.
- (241) Meyer, C.; Köhn, M. Efficient Scaled-Up Synthesis of N-Alpha-Fmoc-4-Phosphono(difluoromethyl)-L-Phenylalanine and Its Incorporation into Peptides. *Synthesis (Stuttg.)* **2011**, *2011* (20), 3255–3260.
- (242) Fields, G. B. Methods for Removing the Fmoc Group. In *Methods in Molecular Biology Vol 35 Peptide Synthesis Protocols*; Pennington, M. W., Dunn, B. M., Eds.; Totowa, 1994; Vol. 35, pp 17–27.
- (243) Nuijens, T.; Kruijtzter, J. A. W.; Cusan, C.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; Quaedflieg, P. J. L. M. A Versatile and Selective Chemo-Enzymatic Synthesis of Beta-Protected Aspartic and Gamma-Protected Glutamic Acid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (23), 2719–2721.
- (244) Taylor, J. G.; Li, X.; Oberthür, M.; Zhu, W.; Kahne, D. E. The Total Synthesis of Moenomycin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (47), 15084–15085.
- (245) Jansson, K.; Ahlfors, S.; Frejd, T. 2-(Trimethylsilyl) Ethyl Glycosides. 3. Synthesis, Anomeric Deblocking, and Transformation into 1, 2-Trans 1-O-Acyl Sugars. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (24), 5629–5647.
- (246) Motiei, L.; Rahimipour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C.-H.; Ghadiri, M. R. Antibacterial Cyclic D,L-Alpha-Glycopeptides. *Chem. Commun.* **2009**, Jul 7 (25), 3693–3695.
- (247) Farrera-Sinfreu, J.; Royo, M.; Albericio, F. Undesired Removal of the Fmoc Group by the Free Epsilon-Amino Function of a Lysine Residue. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7813–7815.
- (248) Zhang, Y.; Muthana, S. M.; Farnsworth, D.; Ludek, O.; Adams, K.; Barchi, J. J.; Gildersleeve, J. C. Enhanced Epimerization of Glycosylated Amino Acids during Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (14), 6316–6325.
- (249) Williams, M. W.; Young, G. T. Amino-Acids and Peptides. Part XVI. Further Studies of Racemisation during Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc.* **1963**, *1963*, 881–889.
- (250) Schmuck, C.; Rehm, T.; Geiger, L.; Schäfer, M. Synthesis and Self-Association Properties of Flexible Guanidiniocarbonylpyrrole-Carboxylate Zwitterions in DMSO: Intra- versus Intermolecular Ion Pairing. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (16), 6162–6170.
- (251) Gu, M.; Yan, J.; Bai, Z.; Chen, Y.-T.; Lu, W.; Tang, J.; Duan, L.; Xie, D.; Nan, F.-J. Design and Synthesis of Biotin-Tagged Photoaffinity Probes of Jasmonates. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (9), 3012–3019.
- (252) Sajiki, H. Selective Inhibition of Benzyl Ether Hydrogenolysis with Pd/C Due to the Presence of Ammonia, Pyridine or Ammonium Acetate. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (20), 3465–3468.
- (253) Blaser, A.; Palmer, B. D.; Sutherland, H. S.; Kmentova, I.; Franzblau, S. G.; Wan, B.; Wang, Y.; Ma, Z.; Thompson, A. M.; Denny, W. A. Structure-Activity Relationships for Amide-, Carbamate-, and Urea-Linked Analogues of the Tuberculosis Drug (6S)-2-Nitro-6-[[4-Trifluoromethoxy)benzyl]oxy}-6,7-Dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (1), 312–326.
- (254) Bailey, C.; Baker, E.; Hayler, J.; Kane, P. Amidine Protection For Solution Phase Library Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (26), 4847–4850.
- (255) Bodanszky, M.; Bodanszky, A. Acceptors in the Removal of Protecting Groups. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *23* (3), 287–291.

- (256) Frost, C. G.; Howarth, J.; Williams, J. M. J. Selectivity in Palladium Catalysed Allylic Substitution. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3 (9), 1089–1122.
- (257) Nishimura, S.-I.; Shimawaki, K. Method for Solid-Phase Synthesis of Glycopeptide Using Silicon-Containing Protecting Group and Synthesis Device. WO2010/103857A1, 2010.
- (258) Meienhofer, J.; Kuromizu, K. Catalytic Hydrogenolysis in Liquid Ammonia: Stability and Cleavage of Some Protecting Groups Used in Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15 (37), 3259–3262.
- (259) Matsuura, S.; Niu, C.-H.; Cohen, J. S. Pyridinium Polyhydrogen Fluoride, a Deprotecting Reagent in Peptide Chemistry. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 1976 (12), 451–452.
- (260) Zang, L.; Shang, H.; Wei, D.; Jiang, S. A Multi-Stimuli-Responsive Organogel Based on Salicylidene Schiff Base. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, 185, 389–397.
- (261) Verma, C.; Sharma, S.; Pathak, A. A Phosgene and Peroxide-Free One-Pot Tandem Synthesis of Isatoic Anhydrides Involving Anthranilic Acid, Boc Anhydride, and 2-Chloro-N-Methyl Pyridinium Iodide. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54 (50), 6897–6899.
- (262) Ponnusamy, E.; Fotadar, U.; Spisni, A.; Fiat, D. A Novel Method for the Rapid Non-Aqueous Tert-Butoxycarbonylation of Some ¹⁷O-Labeled Amino Acids and ¹⁷O-N.M.R. Parameters of the Products. *Synthesis (Stuttg)*. **1986**, 1986 (1), 48–49.
- (263) Hakimelahi, G. H.; Shia, K.-S.; Xue, C.; Hakimelahi, S.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Saboury, A. A.; Khalafi-Nezhad, A.; Soltani-Rad, M. N.; Osyetov, V.; Wang, K.; Liao, J.-H.; Luo, F.-T. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Beta-Lactam-Based Prodrugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10 (11), 3489–3498.
- (264) Favre, A.; Grugier, J.; Brans, A.; Joris, B.; Marchand-Brynaert, J. 6-Aminopenicillanic Acid (6-APA) Derivatives Equipped with Anchoring Arms. *Tetrahedron* **2012**, 68 (52), 10818–10826.
- (265) Alder, R. W.; Bowman, P. S.; Steele, W. R. S.; Winterman, D. R. The Remarkable Basicity of 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene. *Chem. Commun.* **1968**, 1968, 723–724.
- (266) Tsukamoto, H.; Suzuki, T.; Kondo, Y. Remarkable Solvent Effect on Pd(0)-Catalyzed Deprotection of Allyl Ethers Using Barbituric Acid Derivatives: Application to Selective and Successive Removal of Allyl, Methallyl, and Prenyl Ethers. *Synlett* **2007**, 2007 (20), 3131–3136.
- (267) Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (22), 3404–3409.
- (268) Nortcliffe, A.; Fleming, I. N.; Botting, N. P.; O'Hagan, D. Synthesis and Anticancer Properties of RGD Peptides Conjugated to Nitric Oxide Releasing Functional Groups and Abiraterone. *Tetrahedron* **2014**, 70 (44), 8343–8347.
- (269) Maillère, B.; Delluc Desroches, S. Procédé D'évaluation de L'immunogénicité Des Protéines. FR2940451A1, 2006.
- (270) Rieder, M. J.; Uetrecht, J.; Shear, N. H.; Spielberg, S. P. Synthesis and in Vitro Toxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfonamides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, 244 (2), 724–728.
- (271) Castrejon, J. L.; Lavergne, S. N.; El-Sheikh, A.; Farrell, J.; Maggs, J. L.; Sabbani, S.; O'Neill, P. M.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. Metabolic and Chemical Origins of Cross-Reactive Immunological Reactions to Arylamine Benzenesulfonamides: T-Cell Responses to Hydroxylamine and Nitroso Derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, 23 (1), 184–192.

- (272) Turesky, R. J.; Skipper, P. L.; Tannenbaum, S. R. Binding of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-F]quinoline to Hemoglobin and Albumin in Vivo in the Rat. Identification of an Adduct Suitable for Dosimetry. *Carcinogenesis* **1987**, *8* (10), 1537–1542.
- (273) Dölle, B.; Töpner, W.; Neumann, H.-G. Reaction of Arylnitroso Compounds with Mercaptans. *Xenobiotica* **1980**, *10* (7/8), 527–536.
- (274) Piggott, A. M.; Karuso, P. Hydrolysis Rates of Alkyl and Aryl Sulfinamides: Evidence of General Acid Catalysis. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (42), 7452–7455.
- (275) Sheikh, M. C.; Takagi, S.; Yoshimura, T.; Morita, H. Mechanistic Studies of DCC/HOBt-Mediated Reaction of 3-Phenylpropionic Acid with Benzyl Alcohol and Studies on the Reactivities of “active Ester” and the Related Derivatives with Nucleophiles. *Tetrahedron* **2010**, *66* (36), 7272–7278.
- (276) Ramage, R.; Stewart, A. S. J. Peptide Synthesis: Synthesis of the Cysteine-Containing Peptides of Biological and Pharmaceutical Interest, Alpha-H-ANF and H-Big Endothelin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1947–1952.
- (277) Rijkers, D. T. S.; Kruijtzter, J. A. W.; Killian, J. A.; Liskamp, R. M. J. A Convenient Solid Phase Synthesis of S-Palmitoyl Transmembrane Peptides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (19), 3341–3345.
- (278) Postma, T. M.; Giraud, M.; Albericio, F. Trimethoxyphenylthio as a Highly Labile Replacement for Tert-Butylthio Cysteine Protection in Fmoc Solid Phase Synthesis. *Org. Lett.* **2012**, *14* (21), 5468–5471.
- (279) Denis, B.; Trifilieff, E. Synthesis of Palmitoyl-Thioester T-Cell Epitopes of Myelin Proteolipid Protein (PLP). Comparison of Two Thiol Protecting Groups (StBu and Mmt) for on-Resin Acylation. *J. Pept. Sci.* **2000**, *6* (8), 372–377.
- (280) Barlos, K.; Gatos, D.; Hatzi, O.; Koch, N.; Koutsogianni, S. Synthesis of the Very Acid-Sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and Its Application in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47* (3), 148–153.
- (281) Campo, V. L.; Carvalho, I.; Allman, S.; Davis, B. G.; Field, R. A. Chemical and Chemoenzymatic Synthesis of Glycosyl-Amino Acids and Glycopeptides Related to Trypanosoma Cruzi Mucins. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (16), 2645–2657.
- (282) Fernández-Llamazares, A. I.; Spengler, J.; Albericio, F. The Potential of N-Alkoxyethyl Groups as Peptide Backbone Protectants. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (1), 184–188.
- (283) Cherkupally, P.; Ramesh, S.; Govender, T.; Kruger, H. G.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. An Efficient Solid-Phase Strategy for Total Synthesis of Naturally Occurring Amphiphilic Marine Siderophores: Amphibactin-T and Moanachelin Ala-B. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (16), 4760–4768.
- (284) Martín, M. J.; Rodríguez-Acebes, R.; García-Ramos, Y.; Martínez, V.; Murcia, C.; Digo, I.; Marco, I.; Pelay-Gimeno, M.; Fernández, R.; Reyes, F.; Francesch, A.; Munt, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Cuevas, C. Stellatolides, a New Cyclodepsipeptide Family from the Sponge Ecionemia Acervus: Isolation, Solid-Phase Total Synthesis, and Full Structural Assignment of Stellatolide A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (18), 6754–6762.
- (285) Wang, T.; Kartika, R.; Spiegel, D. A. Exploring Post-Translational Arginine Modification Using Chemically Synthesized Methylglyoxal Hydroimidazolones. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (21), 8958–8967.

- (286) MacDonald, M.; Lanier, M.; Cashman, J. Solid-Phase Synthesis of Phosphonylated Peptides. *Synlett* **2010**, 2010 (13), 1951–1954.
- (287) Wang, P.; Nilsson, J.; Brinkmalm, G.; Larson, G.; Huang, X. Synthesis Aided Structural Determination of Amyloid- β (1-15) Glycopeptides, New Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (95), 15067–15070.
- (288) Qian, W.-J.; Park, J.-E.; Lee, K. S.; Burke, T. R. Non-Proteinogenic Amino Acids in the pThr-2 Position of a Pentamer Peptide That Confer High Binding Affinity for the Polo Box Domain (PBD) of Polo-like Kinase 1 (Plk1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (24), 7306–7308.
- (289) Nakabayashi, S.; Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. The Preparation of a Partially Protected Heptasaccharide-Asparagine Intermediate for Glycopeptide Synthesis. *Carbohydr. Res.* **1988**, 174, 279–289.
- (290) Branderhorst, H. M.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. Solid-Phase Carbohydrate Synthesis via on-Bead Protecting Group Chemistry. *Tetrahedron* **2007**, 63 (20), 4290–4296.
- (291) Luković, E.; Gonzalez-Vera, J. A.; Imperiali, B. Recognition-Domain Focused Chemosensors: Versatile and Efficient Reporters of Protein Kinase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (38), 12821–12827.
- (292) Seyberth, T.; Voss, S.; Brock, R.; Wiesmüller, K.-H.; Jung, G. Lipolanthionine Peptides Act as Inhibitors of TLR2-Mediated IL-8 Secretion. Synthesis and Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (5), 1754–1765.
- (293) You, S.-L.; Kelly, J. W. Total Synthesis of Dendroamide a: Oxazole and Thiazole Construction Using an Oxodiphosphonium Salt. *J. Org. Chem.* **2003**, 68 (24), 9506–9509.
- (294) Takahashi, D. Benzylic Compound. US2011/160433A1, 2011.
- (295) Sureshbabu, V. V.; Vishwanatha, T. M.; Vasantha, B. A Simple Synthesis of Nbeta-Fmoc/Z-Amino Alkyl Thiols and Their Use in the Synthesis of Nbeta-Fmoc/Z-Amino Alkyl Sulfonic Acids. *Synlett* **2010**, 2010 (7), 1037–1042.
- (296) Zheng, T.-C.; Richardson, D. E. Manganese Porphyrin Catalyzed Homogeneous Aqueous Oxidation of Organic Molecules by Magnesium Monoperoxyphthalate (MMPP). *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (6), 837–840.
- (297) Lum, R. T.; Cheng, M.; Cristobal, C. P.; Goldfine, I. D.; Evans, J. L.; Keck, J. G.; Macsata, R. W.; Mancham, V. P.; Matsumoto, Y.; Park, S. J.; Rao, S. S.; Robinson, L.; Shi, S.; Spevak, W. R.; Schow, S. R. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Novel Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activators. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (19), 6173–6187.
- (298) Varano, F.; Catarzi, D.; Colotta, V.; Squarcialupi, L.; Matucci, R. 1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-Dioxide Derivatives as Ionotropic Glutamate Receptor Ligands: Synthesis and Structure-Activity Relationships. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**, 347 (11), 777–785.
- (299) Al-Riyami, L.; Pineda, M. A.; Rzepecka, J.; Huggan, J. K.; Khalaf, A. I.; Suckling, C. J.; Scott, F. J.; Rodgers, D. T.; Harnett, M. M.; Harnett, W. Designing Anti-Inflammatory Drugs from Parasitic Worms: A Synthetic Small Molecule Analogue of the *Acanthocheilonema viteae* Product ES-62 Prevents Development of Collagen-Induced Arthritis. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 9982–10002.
- (300) Christensen, M. K.; Erichsen, K. D.; Olesen, U. H.; Tjørnelund, J.; Fristrup, P.; Thougard, A.; Nielsen, S. J.; Sehested, M.; Jensen, P. B.; Loza, E.; Kalvinsh, I.; Garten, A.; Kiess, W.;

- Björkling, F. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitors, Design, Preparation, and Structure–Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 9071–9088.
- (301) Blotny, G. A New, Mild Preparation of Sulfonyl Chlorides. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (7), 1499–1501.
- (302) De Luca, L.; Giacomelli, G. An Easy Microwave-Assisted Synthesis of Sulfonamides Directly from Sulfonic Acids. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (10), 3967–3969.
- (303) Pancheva, S. S.; Kalauzka, R. H.; Jovcheva, E. S.; Dzimbova, T. A.; Popgeorgieva, E. P.; Pajpanova, T. I. Novel Cysteic Acid S-Amides Substituted in the Sulfonamide Function. Synthesis and Modifications. *Bulg. Chem. Commun.* **2012**, *44* (3), 222–227.
- (304) Enders, D.; Moll, A. Asymmetric Synthesis of Cis-3,4-Disubstituted Beta-Sultams. *Synthesis (Stuttg.)* **2005**, *2005* (11), 1807–1816.
- (305) Bahrami, K.; Khodaei, M. M.; Khaledian, D. Synthesis of Sulfonyl Chlorides and Thiosulfonates from H₂O₂–TiCl₄. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (3), 354–358.
- (306) Bahrami, K.; Khodaei, M.; Soheilizad, M. A Novel, Practical Synthesis of Sulfonyl Chlorides from Thiol and Disulfide Derivatives. *Synlett* **2009**, *2009* (17), 2773–2776.
- (307) Bahrami, K.; Khodaei, M. M.; Soheilizad, M. Direct Conversion of Thiols to Sulfonyl Chlorides and Sulfonamides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (24), 9287–9291.
- (308) Prakash, G. K. S.; Mathew, T.; Panja, C.; Olah, G. A. Chlorotrimethylsilane-Nitrate Salts as Oxidants: Direct Oxidative Conversion of Thiols and Disulfides to Sulfonyl Chlorides. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (15), 5847–5850.
- (309) Park, Y. J.; Shin, H. H.; Kim, Y. H. Convenient One-Pot Synthesis of Sulfonyl Chlorides from Thiols Using Sulfuryl Chloride and Metal Nitrate. *Chem. Lett.* **1992**, *1992* (8), 1483–1486.
- (310) Churcher, I.; Harrison, T.; Kerrad, S.; Nadin, A. J.; Owens, A. P.; Shaw, D. E.; Thomson, J.; Williams, S. Cyclohexyl Sulphones as Gamma-Secretase Inhibitors. WO2004/031139A1, 2004.
- (311) Meinzer, A.; Breckel, A.; Thaher, B. A.; Manicone, N.; Otto, H.-H. Properties and Reactions of Substituted 1,2-Thiazetidine 1,1-Dioxides: Chiral Mono- and Bicyclic 1,2-Thiazetidine 1,1-Dioxides from Alpha-Amino Acids. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 90–105.
- (312) Madabhushi, S.; Jillella, R.; Sriramoju, V.; Singh, R. Oxyhalogenation of Thiols and Disulfides into Sulfonyl Chlorides/bromides Using Oxone-KX (X = Cl or Br) in Water. *Green Chem.* **2014**, *16* (6), 3125–3131.
- (313) Nishiguchi, A.; Maeda, K.; Miki, S. Sulfonyl Chloride Formation from Thiol Derivatives by N - Chlorosuccinimide Mediated Oxidation. *Synthesis (Stuttg.)* **2006**, *2006* (24), 4131–4134.
- (314) Pu, Y.-M.; Christesen, A.; Ku, Y.-Y. A Simple and Highly Effective Oxidative Chlorination Protocol for the Preparation of Arenesulfonyl Chlorides. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (2), 418–421.
- (315) Joyard, Y.; Papamicaël, C.; Bohn, P.; Bischoff, L. Synthesis of Sulfonic Acid Derivatives by Oxidative Deprotection of Thiols Using Tert-Butyl Hypochlorite. *Org. Lett.* **2013**, *15* (9), 2294–2297.
- (316) Mintz, J.; Walling, C. Tert-Butyl Hypochlorite. *Org. Synth.* **1969**, *49*, 9.

- (317) Anantharamaiah, G. M.; Sivanandaiah, K. M. Transfer Hydrogenation; a Convenient Method for Removal of Some Commonly Used Protecting Groups in Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1977**, 1977 (5), 490–491.
- (318) Felix, A. M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Tzougraki, C.; Meienhofer, J. Rapid Removal of Protecting Groups from Peptides by Catalytic Transfer Hydrogenation with 1,4-Cyclohexadiene. *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (21), 4194–4196.
- (319) Elamin, B.; Anantharamaiah, G. M.; Royer, G. P.; Means, G. E. Removal of Benzyl-Type Protecting Groups from Peptides by Catalytic Transfer Hydrogenation with Formic Acid. *J. Org. Chem.* **1979**, 44 (19), 3442–3444.
- (320) Sridhar, R.; Srinivas, B.; Kumar, V. P.; Narender, M.; Rao, K. R. Beta-Cyclodextrin-Catalyzed Monosulfonylation of Amines and Amino Acids in Water. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349 (11-12), 1873–1876.
- (321) Ozdemir, N.; Erkin, J. Enhancement of Dissolution Rate and Bioavailability of Sulfamethoxazole by Complexation with Beta-Cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2012**, 38 (3), 331–340.
- (322) Garnero, C.; Aiassa, V.; Longhi, M. Sulfamethoxazole: Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Complex: Preparation and Characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, 63, 74–79.
- (323) Tan, B. Y.-H.; Teo, Y.-C.; Seow, A.-H. Low Catalyst Loadings for Ligand-Free Copper(I)-Oxide-Catalyzed N-Arylation of Methanesulfonamide in Water. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (7), 1541–1546.
- (324) Rosen, B. R.; Ruble, J. C.; Beauchamp, T. J.; Navarro, A. Mild Pd-Catalyzed N-Arylation of Methanesulfonamide and Related Nucleophiles: Avoiding Potentially Genotoxic Reagents and Byproducts. *Org. Lett.* **2011**, 13 (10), 2564–2567.
- (325) Burton, G.; Cao, P.; Li, G.; Rivero, R. Palladium-Catalyzed Intermolecular Coupling of Aryl Chlorides and Sulfonamides under Microwave Irradiation. *Org. Lett.* **2003**, 5 (23), 4373–4376.
- (326) Deng, W.; Liu, L.; Zhang, C.; Liu, M.; Guo, Q.-X. Copper-Catalyzed Cross-Coupling of Sulfonamides with Iodides and Bromides Facilitated by Amino Acid Ligands. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46 (43), 7295–7298.
- (327) He, H.; Wu, Y.-J. Copper-Catalyzed N-Arylation of Sulfonamides with Aryl Bromides and Iodides Using Microwave Heating. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (16), 3385–3386.
- (328) Wang, X.; Guram, A.; Ronk, M.; Milne, J. E.; Tedrow, J. S.; Faul, M. M. Copper-Catalyzed N-Arylation of Sulfonamides with Arylbromides under Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53 (1), 7–10.
- (329) Yamasaki, T.; Saitoh, Y.; Kondo, C. Prophylactic or Ameliorating Agent for Pigmentation. US2012/282203A1, 2012.
- (330) Suenobu, N.; Kondo, C.; Yamasaki, T. Anti-Wrinkle Agents. US2011/245343A1, 2011.
- (331) Suzuki, T.; Koshiba, T.; Tokumasu, M.; Ohsumi, K. Heterocyclic Carboxylic Acid Ester Derivative. US2014/094489A1, 2014.
- (332) Konishi, A.; Tokumasu, M.; Suzuki, T.; Koshiba, T.; Ohsumi, K.; Ikehara, O.; Kodama, Y. Heteroarylcarboxylic Acid Ester Derivative. US2015/011511A1, 2015.

- (333) Herold, P.; Stutz, S.; Stojanovic, A.; Tschinke, V.; Marti, C.; Quirnbach, M. Diamino Alcohols and Their Use as Renin Inhibitors. WO2005/070877A1, 2005.
- (334) Moon, S.-Y.; Nam, J.; Rathwell, K.; Kim, W.-S. Copper-Catalyzed Chan-Lam Coupling between Sulfonyl Azides and Boronic Acids at Room Temperature. *Org. Lett.* **2014**, *16* (2), 338–341.
- (335) Brouwer, A. J.; Merx, R.; Dabrowska, K.; Rijkers, D. T.; Liskamp, R. M. Synthesis and Applications of Beta-Aminoethanesulfonyl Azides. *Synthesis (Stuttg.)* **2006**, *2006* (3), 455–460.
- (336) Veisi, H.; Ghorbani-Vaghei, R.; Hemmati, S.; Mahmoodi, J. Convenient One-Pot Synthesis of Sulfonamides and Sulfonyl Azides from Thiols Using N-Chlorosuccinimide. *Synlett* **2011**, *2011* (16), 2315–2320.
- (337) Hazen, G. G.; Bollinger, F. W.; Roberts, F. E.; Russ, W. K.; Seman, J. J.; Staskiewicz, S. 4-Dodecylbenzenesulfonyl Azides. *Org. Synth.* **1996**, *73*, 144.
- (338) Erb, W.; Albin, M.; Rouden, J.; Blanchet, J. Sequential One-Pot Access to Molecular Diversity through Aniline Aqueous Borylation. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 10568–10580.
- (339) Erb, W.; Hellal, A.; Albin, M.; Rouden, J.; Blanchet, J. An Easy Route to (hetero)arylboronic Acids. *Chemistry* **2014**, *20* (22), 6608–6612.
- (340) Grubaugh, D.; Flechtner, J. B.; Higgins, D. E. Proteins as T Cell Antigens: Methods for High-Throughput Identification. *Vaccine* **2013**, *31* (37), 3805–3810.
- (341) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512–7515.
- (342) Huhtiniemi, T.; Suuronen, T.; Lahtela-Kakkonen, M.; Bruijn, T.; Jääskeläinen, S.; Poso, A.; Salminen, A.; Leppänen, J.; Jarho, E. N(epsilon)-Modified Lysine Containing Inhibitors for SIRT1 and SIRT2. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (15), 5616–5625.
- (343) Seok Choi, J.; Kang, H.; Jeong, N.; Han, H. Orthogonality and Compatibility between Tsc and Fmoc Amino-Protecting Groups. *Tetrahedron* **2005**, *61* (9), 2493–2503.
- (344) Seebach, D.; Dubost, E.; Mathad, R. I.; Jaun, B.; Limbach, M.; Löweneck, M.; Flögel, O.; Gardiner, J.; Capone, S.; Beck, A. K.; Widmer, H.; Langenegger, D.; Monna, D.; Hoyer, D. New Open-Chain and Cyclic Tetrapeptides, Consisting of Alpha-, beta2-, and beta3-Amino-Acid Residues, as Somatostatin Mimics – A Survey. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91* (9), 1736–1786.
- (345) Kappel, J. C.; Barany, G. A Convenient Orthogonally Cleavable Methionine Handle for Anchoring Amines to Polymeric Supports. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7* (1), 78–84.
- (346) Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; Gonzalez-Alvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E. In Vivo and in Vitro Anti-Leishmanial Activities of 4-Nitro-N-Pyrimidin- and N-Pyrazin-2-Ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-Nitrophenyl)-N1-Propylglycinamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (21), 7449–7456.
- (347) Fujimoto, M.; Okabe, K. Synthèse Des Dérivés Acylés de La Sulfisomézole. *Chem. Pharm. Bull.* **1962**, *10* (7), 572–575.
- (348) Dauty, E.; Remy, J.; Blessing, T.; Behr, J.-P. Dimerizable Cationic Detergents with a Low Cmc Condense Plasmid DNA into Nanometric Particles and Transfect Cells in Culture. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (38), 9227–9234.

- (349) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1781–1802.
- (350) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4* (2), 187–217.
- (351) Mackerell, A. D.; Banavali, N.; Foloppe, N. Development and Current Status of the CHARMM Force Field for Nucleic Acids. *Biopolymers* **2000**, *56* (4), 257–265.
- (352) Zhu, X.; Lopes, P. E. M.; Mackerell, A. D. Recent Developments and Applications of the CHARMM Force Fields. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 167–185.
- (353) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An Nlog(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092.
- (354) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593.

Titre : Etude de l'allergie aux antibiotiques : synthèse de peptides antigéniques

Mots clés : Synthèse d'acides aminés hapténisés, Synthèse peptidique, Bioconjugués, Pénicillines, Sulfamides

Résumé : Un certain nombre de principes actifs sont responsables d'hypersensibilité allergique, en particulier les pénicillines et les sulfamides. Selon la théorie de l'haptène, ces principes actifs ne peuvent pas induire de réaction immunitaire par eux-mêmes, mais doivent être liés à une protéine. Ces protéines hapténisées par un antibiotique sont capturées puis digérées par des cellules présentatrices d'antigènes, qui présentent aux lymphocytes T des peptides issus de la protéine digérée. Les peptides hapténisés peuvent activer le système immunitaire des patients allergiques. Ce travail de thèse porte sur la sélection et la synthèse de peptides modifiés par les antibiotiques étudiés, dans le but de trouver ces peptides immunogènes. Pour réaliser cette étude, l'albumine du sérum humain (HSA) a été choisie comme protéine modèle. Son hapténisation a été étudiée pour trois principes actifs de forte prévalence allergique : la pénicilline G, l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole. L'analyse par spectrométrie

de masse des bioconjugués HSA-antibiotique a permis l'identification des acides aminés hapténisés pour la conception et la sélection par des méthodes *in silico* de peptides de 15-mers potentiellement immunogènes. La synthèse de ces peptides implique la préparation d'un monomère acide aminé-haptène stable pour une synthèse orientée de peptides d'enchaînements diversifiés. Pour les antibiotiques de la famille des pénicillines, cette synthèse s'est orchestrée autour d'une étape clé : l'ouverture du cycle β -lactame par une lysine. En ce qui concerne le sulfamide sulfaméthoxazole, la synthèse du monomère stable cystéine-sulfaméthoxazole a reposé sur une étape clé de couplage entre le sulfaméthoxazole et un acide cystéique. A partir du monomère lysine-pénicilline G, des peptides ont déjà été synthétisés et testés sur des lymphocytes T. L'effet immunogène et leur valorisation en tant qu'outils pour le diagnostic sont en cours d'évaluation.

Title: Study of antibiotics allergy: synthesis of antigenic peptides

Keywords: Synthesis of haptenized amino-acids, Peptide synthesis, Bioconjugates, Penicillins, Sulfonamides

Abstract: Many drugs are responsible of allergic reactions, in particular penicillins and sulfonamides. As these antibiotics respond to the hapten theory, they cannot induce the immune system by themselves, but have to bind a protein. These haptenized proteins are detected then digested by antigen presenting cells into peptides which are presented to T cells. These haptenized peptides are responsible of the activation of the immune system in allergic patient. The aim of this study is to select and synthesize immunogenic peptides, modified by selected antibiotics. The human serum albumin (HSA) was chosen as a model protein. It hapténization was studied for three drugs with high allergic prevalence: benzylpenicillin, amoxicillin and sulfamethoxazole. Mass analysis of the resulting bioconjugates HSA-antibiotic

allowed identification of haptenized amino-acid which were used to design and select through *in silico* methods potentially immunogenic 15-mers peptides. The synthesis of these peptides implies the preparation of stable amino-acid-hapten monomers for an oriented synthesis of diversified peptidic sequences. For penicillins, this synthesis was based on a key step: the opening of the penicillins β -lactam ring by a lysine. Regarding the sulfonamide sulfamethoxazole, the synthesis of a stable cysteine-sulfamethoxazole monomer was centered on a coupling key step between the sulfamethoxazole and a cysteic acid. From lysine-benzylpenicillin monomer, peptides have already been synthesized and tested over T cells. Their immunogenic effect and development as tools for diagnosis are being evaluated.

