



Synthèse de nouveaux ligands du récepteur CD1d : applications à la vaccination anti-tumorale

Christophe Ehret

► To cite this version:

Christophe Ehret. Synthèse de nouveaux ligands du récepteur CD1d : applications à la vaccination anti-tumorale. Autre. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAF006 . tel-00767140

HAL Id: tel-00767140

<https://theses.hal.science/tel-00767140>

Submitted on 19 Dec 2012

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

LCAMB – UMR7199

THÈSE

présentée par

Christophe Ehret

soutenue le 07 Juin 2012

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Sciences Chimiques

Synthèse de nouveaux ligands du récepteur CD1d : applications à la vaccination anti- tumorale

THÈSE dirigée par :

M. FRISCH Benoit

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme PASSIRANI Catherine

M. BOTURYN Didier

Professeur, Université d'Angers

Docteur, Université de Grenoble

MEMBRE DU JURY :

Mme TRIFILIEFF Elisabeth

Docteur, Université de Strasbourg

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Docteur Benoît Frisch au sein du laboratoire de Biovectorologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Tout d'abord, je remercie le Docteur Benoît Frisch pour son accueil au laboratoire ainsi que son investissement au cours de ma thèse. Enfin, je le remercie pour la révision de mon manuscrit et ses conseils judicieux.

Je remercie le Docteur Béatrice Heurtault pour son aide au cours de ma thèse, que ce soit au niveau pratique ou pour ses conseils, ainsi que pour sa participation à la révision de mon manuscrit.

Je remercie le Docteur François Trottein et toute son équipe de l'Institut Pasteur de Lille, pour leur collaboration et leur apport technique et scientifique dans ce projet, notamment dans les études immunologiques *in vitro* et *in vivo*. Je remercie également le Professeur Sylvie Fournel de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg, pour sa révision de mon manuscrit et pour sa collaboration lors des études immunologiques *in vivo*.

Je remercie également les membres du jury, le Professeur Catherine Passirani, le Docteur Elisabeth Trifilieff et le Docteur Didier Boturyn pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes et amis de la Faculté de Pharmacie qui ont pu m'aider, m'accompagner et me conseiller au cours de ma thèse.

Pour finir, je remercie toute ma famille, ma femme et tous mes amis pour leur présence, leur soutien et leur confiance au cours de ma thèse et dans le reste de mes études.

Abréviations

Å	Angström
Ac ₂ O	Anhydride acétique
AGL	Agelasphine
AgClO ₄	Perchlorate d'argent
AP	Protéine adaptatrice
Asp	Acide Aspartique
Arg	Arginine
α-GlcA-DAG	α-glucuronosyl diacylglycérol
α-GalCer	Molécule d'α-Galactocéramide
α-GlcCer	Molécule d'α-Glucosylcéramide
α-ManCer	Molécule d'α-Mannosylcéramide
α-O-GalCer	α-GalCer formé par une liaison O Glycosidique
α-S-GalCer	α-GalCer formé par une liaison S Glycosidique
α-C-GalCer	α-GalCer formé par une liaison C Glycosidique
α-ManGalD	α-manogalactosyl-diacylglycérol
BCA	Acide bicinchoninique
BF ₃ .Et ₂ O	Trifluorure de Brome /diethyletherate
BnBr	Bromure de benzyle
BODIPY	Bore-DiPyrométhane
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(diméthylamphosponium)
Br ₂	Dibrome
β-GalCer	β-Galactosylcéramide
β-HexB	β-hexoaminidase B
CaH ₂	Hydruire de calcium
CCl ₃	Trichlorométhane
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Cellule dendritique
CD1d	Corécepteur des α-GalCers reconnu par le TCR invariant des cellules NKT
CDR	« Complementarity Determining Residues »
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CMH-I/II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CpG	Oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG
CR4	Récepteur du complément 4
CTLD	« C-type-Lectin-Like-Domain »
Cy5-COOH	Cyanine 5 acide
δ	Déplacement chimique
Da	Dalton

DAG	Diacylglycérol
DC	« Dendritic cell »
DC-SIGN	« Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin »
DDC	Cellule dendritique dermique
DGK α	DiacylGlycérol Kinase α
DIBAL	Hydruure de diisobutylaluminium
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	4,4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTST	Diméthyl(méthylthio)sulfonium triflate
DN	Double négatif
DO	Densité optique
DPG	1,2-di-palmitoyl-glycérol
DPG-Mal	19-(maléimido)-17-oxo-4,7,10,13-tétraoxa-16-azanonadécane-1,2-diyl dipalmitate
DPPE-PEG ₂₀₀₀	Carbonyl-méthoxypolyéthylèneglycol2000-2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine
DSPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine
ε	Coefficient d'extinction molaire
EAE	Encéphalomyélite auto-immune
EhLPPG	Lipopeptidophosphoglycane
Et ₂ O	Ether
F	Fluor
FITC	Fluoroscéine-Iso-Thio-Cyanate
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Gb3	Globotrihexosylcéramide
Gly	Glycine
GTB	Galactosyltransférase B
GUV	“Giant Unilamellar vesicle”
GM1	Monosialoganglioside
GSL	« Glycosphingolipid »
H ₂	Dihydrogène
h.	Heure(s)
HBr	Bromure d'hydrogène (33 % dans l'acide acétique)
HCl	Acide chlorhydrique
He	Hélium
HEPES	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthanesulfonate
HMDS	Hexaméthylidisylazane
HPLC	« High Performance Liquid Chromatography »
HSPhe	Thiophénol

Hz	Hertz
IFN- γ	Interféron- γ
iGb3	Isoglobotrihexosylcéramide
iGb4	Isoglobotetrahexosylcéramide
IgG	Immunoglobuline de type G
IL	Interleukine
iNKT	« Natural Killer T Cell invariant »
IRM	Imagerie par résonance magnétique
j.	Jour(s)
KHSO ₄	Hydrogénosulfate de potassium
KI	Iodure de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium (potasse)
λ	Longueur d'onde
LC	Cellule de Langerhans
LiAlH ₄	Tétrahydruroaluminate de lithium
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPG	Lipophosphoglycane
LPS	Lipopolysaccharide
LUV	« Large unilamellar vesicle »
MAIT	« Mucosal Associated Invariant T cell »
mDC	Cellule dendritique myéloïde
MeOH	Méthanol
MeONa	Méthanolate de sodium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MHz	Mégahertz
min.	Minute(s)
MLV	« Multilamellar vesicle »
moDC	Cellule dendritique dérivant de monocytes
MR	Récepteur au mannose
MZ	Zone marginale
NaH	Hydruure de sodium (60 % dans l'huile minérale)
NBD	Nitrobenzoxadiazole
N-Br-Succinimide	N-bromosuccinimide
n-BuLi	n-butyl lithium
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO ₃	Hydrogénocarbonate de sodium
NaN ₃	Azoture de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium (soude)
Na ₂ S ₂ O ₃	Thiosulfate de sodium
Ne	Néon

NFAT	« Nuclear Factor of Activated T cells »
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
NIS-TfOH	« N-iodosuccinimide-trifluoro methanesulfonic acid »
NK	Cellule « Natural killer »
NKT	Cellule T « Natural killer »
NMO	N-Méthyl morpholine
NTA ₃ -DTDA	3(nitrilotriacetic acid)-ditetradecylamine
OLV	« Oligolamellar vesicle »
OVA	Ovalbumine
OsO ₄	Tétroxyde d'osmium
p-NO ₂ PhSCI	Para-Nitrobenzenesulfonyl chloride
p-TolSOTf	Para-Tolylsulfonyl-trifluorométhanesulfonate
Pam ₃ CAG/	[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cystéinyl-(S)-alanyl-glycine
Pam ₃ CysAlaGly	
Pam ₂ CAG/	[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-(R)-cystéinyl-(S)-alanyl-glycine
Pam ₂ CysAlaGly	
PAMP	« Pathogen-associated molecular pattern »
PBS	« Phosphate buffered saline »
PC	L-α-Phosphatidylcholine de jaune d'œuf
PD-1	« Programmed Death-1 »
Pd/C	Palladium sur charbon
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PDL-1/PDL-2	« Programmed Death Ligand 1/Programmed Death Ligand 2 »
PE	L-α-Phosphatidyl-DL-éthanolamine
PEG	Polyéthylèneglycol
PG	L-α-Phosphatidyl-DL-glycérol de jaune d'œuf
Phe	Phénylalanine
PhSOTf	Benzenesulfonyl triflate
PI	L-α-Phosphatidyl-DL-inositol
PIM4	Tétramannosylphosphatidylinositol
PLA	« Poly Lactic Acid »
PLGA	« Poly(D,L Lactic-co-Glycolic Acid) »
PPh ₃	Triphényl phosphine
ppm	Partie par million
PRR	« Pattern Recognition Receptor »
Rdt	Rendement
REV	« Reverse phase evaporation vesicle »
Rf	Rétention frontale
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Ser	Serine

SnCl ₂	Chlorure d'étain
SnCl ₄	Tétrachlorure d'étain
SUV	« Small unilamellar vesicle »
t.a.	Température ambiante
TAA	« Tumor Associated Antigens »
TBAI	Tétra-butyl ammonium iodide
tBuOH	<i>Tert</i> -butanol
TBABr	Bromure de tétra butyl ammonium
TCEP	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TCR	Récepteur des cellules T
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
THF	Tétrahydrofurane
TIR	« Toll-IL-1 receptor »
TLR	« Toll-like receptor »
TMS	Triméthyl silane
TMSOTf	Triméthylsilyl trifluorométhane sulfonate
TNF- α	« Tumor necrosis factor α »
TsCl	Chlorure de tosylate
UV	Ultra-violet
WT	« Wild type »

Sommaire

CHAPITRE I :	1
INTRODUCTION GENERALE	1
I) GENERALITES	3
II) LES CELLULES NKTS	4
A) <i>Historique sur les cellules NKTS</i>	4
B) <i>Caractérisation des cellules NKTS</i>	5
C) <i>Sous-types de cellules NKTS</i>	6
1) Cellules iNKTS V α 14-J α 18 ⁺ NK1.1 ⁺ CD1d dépendante (Type I).....	6
2) Cellules iNKTS V α 14-J α 18 ⁺ NK1.1 ⁻ CD1d dépendante (Type I).....	6
3) Cellules NKTS V α 14-J α 18 ^{-/-} CD1d dépendante (Type II).....	7
4) Cellules NKTS NK1.1 ⁺ CD1d indépendante	7
5) Autres cellules T semi-invariantes	7
III) LES CELLULES DENDRITIQUES	8
IV) LE COMPLEXE CD1D	10
A) <i>Généralités sur la famille de molécules du CD1</i>	10
B) <i>La molécule CD1d</i>	13
C) <i>Le complexe CD1d-cellule iNKT</i>	13
V) ANERGIE DES CELLULES NKTS	15
A) <i>Généralités sur l'anergie des cellules T-CD4⁺</i>	15
B) <i>Anergie des cellules NKT</i>	17
VI) LIGANDS RECONNUS PAR LES CELLULES iNKTS, VIA LA MOLECULE DU CD1D	18
A) <i>Découverte d'un ligand de CD1d</i>	18
B) <i>Ligands phospholipidiques endogènes</i>	19
C) <i>Ligands glycosphingolipidiques endogènes</i>	19
D) <i>Ligands d'origines microbiennes</i>	22
VII) RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES α -GALACTOSYLCERAMIDES.....	23
A) <i>Généralités</i>	23
B) <i>Modifications de la tête osidique</i>	25
1) <i>Modification du sucre</i>	25
2) <i>Modification de la position 2</i>	26
3) <i>Modification de la position 3</i>	27
4) <i>Modification de la position 4</i>	28
5) <i>Modification de la position 6</i>	29
6) <i>Modification de l'oxygène pyranosique</i>	31
C) <i>Modification de la partie anomérique</i>	31
D) <i>Modification de la partie polaire de la céramide</i>	34
E) <i>Modification de la partie hydrophobe de la céramide ; chaînes grasses R1 et R2</i>	36
1) <i>Modification de la chaîne aliphatique R1</i>	36
2) <i>Modification de la chaîne aliphatique R2</i>	38
F) <i>Structures cristallographiques du CD1d en présence de ligand analogue du KRN7000</i>	40

<i>G) Balance cytokinique médiée par la reconnaissance du complexe CD1d / α-GalCer par les cellules iNKTs</i>	43
VIII) LES VECTEURS	44
A) Généralités	44
B) Le liposome	45
1) Structure, composition et insertion	45
2) Le liposome <i>in vivo</i>	47
3) Applications thérapeutiques à base de liposomes	48
IX) CONCLUSION	48
CHAPITRE II :	53
SYNTHÈSE D'ANALOGUES D' α -GALCER – RESULTATS ET DISCUSSION	53
I) SYNTHÈSE DE NOUVEAUX ANALOGUES DE L' α -GALCER	55
A) Généralités	55
B) Stratégie de synthèse des analogues du KRN7000 développée dans la littérature	55
1) Stratégie générale	55
2) Synthèse de la partie phytosphingosine	56
a) Synthèse de la [2S, 3S, 4R] phytosphingosine via des dérivés osidiques	56
b) Synthèse de la phytosphingosine via un dérivé sérine	58
c) Synthèse du dérivé [2S, 3S, 4R] phytosphingosine via l'aldéhyde de Garner	59
d) Conclusion	61
3) Couplage de la partie osidique	61
a) Utilisation des dérivés thio-galactosides	61
b) Couplage de dérivés galactose-trichloroacétimidates	62
c) Utilisation de dérivés fluorés	63
d) Utilisation de dérivés iodés	64
e) Utilisation de dérivés bromés	65
f) Conclusion	66
C) Résultats et discussions	66
1) Préambule	66
2) Synthèse de nouveaux analogues du KRN7000	67
a) Synthèse du synthon 1, la partie osidique	67
a.1) Synthèse du 1-acétyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranose	67
a.2) Synthèse du 1-thiophenyl-2, 3, 4-tri-O-benzyl -6-azido-6-deoxy- β -D-galactopyranose	68
b) Synthèse du synthon 2, la partie céramide	69
b.1) Synthèse de l'aldéhyde de Garner	69
b.2) Synthèse de la partie céramide des analogues du KRN7000	71
c) Couplage de Lemieux	73
c.1) Mécanisme réactionnel du couplage de Lemieux	73
c.2) Synthèse des produits 22 et 26 via le couplage de Lemieux	74
d) Synthèse des analogues KRN-Phe	75
d.1) Obtention du KRN-Phe-Tet	75
d.2) Obtention du KRN-Phe-Boc	76

d.3) Obtention du KRN-Phe-NH ₂	76
d.4) Obtention des KRN-Phe-Naph et KRN-Phe-PEG ₂₀₀₀	77
e) Synthèse des analogues KRN-fluorophore	78
e.1) Synthèse du produit 29, précurseur des analogues KRN-fluorophores.....	78
e.2) Obtention des KRN-FITC et KRN-Cy5	79
D) Conclusion	80
II) ACTIVITE BIOLOGIQUES DE NOS ANALOGUES	82
A) Préambule	82
B) Etude biologique de l'activité des analogues KRN-Phe	83
1) Prise en charge des ligands par les hybridomes de cellules iNKT - Résultat et discussion.....	85
2) Prise en charge des analogues par les splénocytes – Evaluation du profil pro-Th1	87
C) Etude du rôle de différents sous-types de cellules dendritiques - Etude avec les molécules KRN-FITC et KRN-Cy5	89
D) Conclusion	91
CHAPITRE III :	95
VECTORISATION DE L'α-GALCER, KRN70000.....	95
I) INTRODUCTION	97
II) VECTORISATION ET OPTIMISATION DE LA DELIVRANCE DU KRN7000	98
A) Notre vecteur, le liposome	98
B) Molécules utilisées pour optimiser la réponse immunitaire.....	99
1) Molécule permettant d'augmenter la biodisponibilité du KRN7000	99
2) Molécules permettant le ciblage actif des DCs	101
a) Ciblage du récepteur mannose.....	101
b) Ciblage du récepteur CD11c	102
3) Molécules permettant la stimulation de la réponse immunitaire adaptative.....	103
a) Ancres Pam ₃ CysAlaGly et Pam ₂ CysAlaGly - Ligands des TLRs 2/1 et 2/6	103
b) Le peptide OVA	104
III) RESULTAT ET DISCUSSION DE LA VECTORISATION DU KRN7000	105
IV) CONCLUSION	106
CHAPITRE IV :	109
REPONSE ANTI-TUMORALE DES CONSTRUCTIONS LIPOSOMIQUES.....	109
I) INTRODUCTION	111
II) RESULTATS ET DISCUSSIONS DE L'OPTIMISATION DE LA REPONSE ANTI-TUMORALE	111
A) Préambule	111
B) Influence du PEG ₂₀₀₀ sur la réponse immunitaire	112
C) Influence de la molécule DOG-Dimannose sur la réponse immunitaire	115
D) Influence du ciblage du récepteur CD11c des DCs.....	118
E) Influence des ligands des TLRs en présence du KRN7000 sur la réponse immunitaire.....	121
F) Influence du peptide OVA sur la réponse immunitaire.....	124
G) Conclusion	127

III) RESULTATS ET DISCUSSIONS SUR LA LEVEE DE L'ANERGIE	128
<i>A) Influence de la furtivité et de la taille des vecteurs.....</i>	<i>128</i>
<i>B) Influence de l'activation des TLRs sur l'anergie</i>	<i>130</i>
<i>C) Conclusion</i>	<i>131</i>
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	135
I) CONCLUSION GENERALE	137
II) PERSPECTIVES.....	140
PARTIES EXPERIMENTALES BIOLOGIQUE ET CHIMIQUE	143
I) PARTIE EXPERIMENTALE BIOLOGIQUE	145
<i>A) Mesures physiques</i>	<i>145</i>
1) Mesures spectrophotométriques et spectrofluorométriques.....	145
2) Mesure de la taille des liposomes	145
<i>B) Dosages</i>	<i>146</i>
1) Dosage des phospholipides.....	146
a) Dosage du phosphate inorganique.....	146
b) Dosage de la phosphatidylcholine par méthode enzymatique	146
2) Dosage des peptides.....	147
a) Dosages des protéines avec le kit BCA (Interchim, Pierce)	147
b) Dosage des peptides avec la méthode de la fluorescamine.....	148
<i>C) Fabrication des fragments Fab' neutre et anti-CD11c</i>	<i>148</i>
<i>D) Analogue du peptide OVA.....</i>	<i>149</i>
<i>E) Fabrication des liposomes</i>	<i>149</i>
1) Les matières premières et molécules synthétiques.....	149
a) Les constituants phospholipidiques	149
b) Les ancres fonctionnalisées et dimannosylées.....	150
c) Les molécules adjuvantes.....	150
2) Protocoles de fabrication des différentes formulations	151
a) Liposomes SUV-KRN-PEG ₂₀₀₀	151
b) Liposomes REV-KRN-PEG ₂₀₀₀	152
c) Liposomes SUV-KRN-Dimannose	153
d) Liposomes SUV-KRN Fab'	154
e) Liposomes SUV-OVA	156
<i>F) Protocoles des tests in vitro et in vivo.....</i>	<i>157</i>
II) PARTIE EXPERIMENTALE CHIMIQUE	158
<i>A) Généralités</i>	<i>158</i>
1) Solvants et réactifs.....	158
2) Mesures physiques	158
a) Spectrométrie de masse	158
b) RMN	158
3) Techniques chromatographiques	159
a) Chromatographie sur couche mince.....	159
b) Chromatographie sur colonne	159

<i>B) Synthèses du KRN 7000 et de ses analogues</i>	<i>160</i>
1) Préparation des synthons glycosidiques	160
2) Synthèse du synthon céramide	170
3) Synthèse des analogues du KRN7000	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199

CHAPITRE I :

Introduction générale

I) Généralités

Notre objectif durant cette thèse aura été d'apporter des outils permettant d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, nous savons que les cellules tumorales présentes dans un organisme sont reconnues par le système immunitaire. En réaction à la présence de cet antigène, le système immunitaire propose deux types de réponses. D'une part une réponse immunitaire non-spécifique ou « innée », caractérisée par l'intervention par exemple des cellules NKs (Natural Killer) ou NKTs (Natural Killer T cell). D'autre part, nous avons une réponse immunitaire spécifique ou « adaptatrice », caractérisée par l'intervention des cellules T-CD8⁺, T-CD4⁺ et des cellules B.

Au milieu des années 90, une molécule glycolipidique naturelle extraite d'une éponge marine, a été identifiée comme étant capable de baisser significativement le nombre de cellules tumorales chez la souris.^[1] La partie active de cette molécule a rapidement été identifiée comme étant une partie α -galactosyl-céramide (α -GalCer). Mais l'extraction de la molécule naturelle pouvant avoir des effets néfastes sur la pérennité de l'éponge marine dans son milieu, l'industrie pharmaceutique a entrepris la synthèse d'analogues glycolipidiques, permettant notamment d'obtenir une molécule appelée KRN7000.^[2] Cette molécule a été testée par la suite chez l'Homme dans le cadre d'une réponse anti-tumorale, mais il s'est avéré que son efficacité était inférieure à celle observée chez la souris.^[3, 4] Afin de pouvoir optimiser cette réponse immunitaire anti-tumorale, plusieurs laboratoires de recherche ont synthétisé cette fois-ci des analogues glycolipidiques du KRN7000.

Le KRN7000 a aussi en parallèle permis d'identifier les mécanismes mis en jeu dans le cadre de la réponse immunitaire anti-tumorale. La voie identifiée et mise en place par l'organisme, est la réponse immunitaire non-spécifique ou « innée », avec notamment l'intervention des cellules NKTs.

Ces cellules NKTs expriment à leur surface plusieurs récepteurs que l'on retrouve sur d'autres cellules immunitaires, comme par exemple le marqueur NK1.1 (NKR-P1 chez la souris ou CD161c pour son homologue humain) que l'on pensait retrouver uniquement sur les cellules NKs. Les cellules NKTs présentent également un TCR (T Cell Receptor, constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β) que l'on pensait présent uniquement sur les lymphocytes T. Mais à l'inverse des cellules T conventionnelles dont le TCR contient des chaînes α et β variables, certaines cellules NKTs expriment un domaine α invariant et sont appelées NKT invariante (iNKT). Ce domaine α est constitué chez la souris des sous-unités V α 14-J α 18, et

chez l'homme de V α 24-J α 18.^[5-7] D'autre part le TCR des cellules T reconnaît des ligands de nature peptidiques grâce à leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I ou II), alors que le TCR des cellules iNKTs prend en charge un ligand de nature glycolipidique.

Cette molécule glycolipidique a permis d'identifier une deuxième cellule immunitaire intervenant dans la lutte anti-tumorale, à savoir une cellule présentatrice d'antigène (CPA).^[8]

Cette CPA est la cellule dendritique (DC) qui possède à sa surface toute une famille de molécule du CD1, dans laquelle on retrouve la molécule du CD1d reconnaissant également les molécules de nature glycolipidique.

Le lien existant entre les deux types de cellules immunitaire identifié (les cellules iNKTs et la DC reconnaissent une molécule glycolipidique, type KRN7000), il a été mis en évidence que les cellules iNKTs sont stimulées, *via* leur TCR, par la présentation du KRN7000 inséré dans le CD1d des DCs. Le KRN7000 va de par sa structure, avoir un impact sur la réponse immunitaire induite par les iNKTs, favorisant soit une réponse pro-Th1, caractérisée par la sécrétion d'IFN- γ favorable à la réponse anti-tumorale, soit une réponse pro-Th2, caractérisée par la sécrétion d'IL-4 et plutôt non-favorable à la réponse anti-tumorale.^[9, 10]

Il est ainsi possible d'observer la réponse mise en place par le système immunitaire, qui peut-être soit une réponse anti-tumorale, soit une réponse anti-bactérienne, anti-virale ou anti-parasitaire, mais aussi une réponse permettant de lutter contre les maladies auto-immunes comme le diabète de type 1, le lupus, l'arthrite rhumatoïde ou encore l'asthme d'origine allergique, ainsi que le rejet de greffons.^[11-13]

II) Les cellules NKTs

A) Historique sur les cellules NKTs

En 1987, trois groupes indépendants ont publié des résultats montrant chez la souris, des cellules T exprimant des récepteurs $\alpha\beta$ -TCR à des niveaux plus faibles que chez les cellules T traditionnelles.^[14-16] Ils ont également remarqué que ces cellules expriment deux à trois fois plus de domaines β V β 8 que les cellules T conventionnelles, avec aussi un manque d'expression des molécules CD4 et CD8.

Au début des années 1990, d'autres groupes découvrirent que des cellules T exprimant des récepteurs $\alpha\beta$ -TCR, exprimaient aussi le récepteur NK1.1 qui était considéré comme spécifique des cellules NKs.^[17, 18] Cela a permis de dire que chez la souris, ces lymphocytes

sont caractérisés par l'expression d'un récepteur TCR et d'un NK1.1. Mais une autre différence est apparue, à savoir que les cellules T conventionnelles reconnaissent des fragments de peptides associés aux molécules du CMH I ou II. Tandis que sur les cellules NKTs, le TCR reconnaît un ligand de nature glycolipidique associé à la molécule analogue du CMH-I, le CD1d.

C'est ainsi que le terme « NKT cell » apparaît pour la première fois en 1995.^[19] Les études sur les NKTs ont été rendues possible grâce à la découverte d'un ligand de la molécule du CD1d et provenant d'une éponge marine (*Agelas mauritanus*). Par la suite, Kawano *et al.* et Morita *et al.* ont synthétisé un analogue de ce ligand, appelé l' α -galactosyl-céramide KRN7000.^[2, 20]

B) Caractérisation des cellules NKTs

Les cellules NKTs ont été les premières cellules immunitaires identifiées, grâce au KRN7000, comme intervenant dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Elles ont été mises en évidence aussi bien chez la souris que chez l'homme et on les retrouve majoritairement dans le foie, où elles représentent jusqu'à 30% des lymphocytes totaux. Elles sont également présentes dans d'autres tissus, dans une moindre proportion (entre 0,5 et 5%), comme le thymus, la moelle osseuse, la rate ou les poumons. On en trouve également dans le système sanguin, les ganglions lymphatiques périphériques et les ganglions lymphatiques pancréatiques.

Il est important de noter que les cellules NKTs, malgré leur ressemblance avec d'autres cellules immunitaires, constituent une famille à elles seules car dans plusieurs cas on peut définir plusieurs sous-populations selon l'expression de co-récepteurs. Ainsi, on trouve chez la souris des cellules exprimant le co-récepteur CD4 ($CD4^+/CD8^-$) ou non (DN ; $CD4^-/CD8^-$). Chez l'homme, on retrouve soit le co-récepteur CD4 ($CD4^+/CD8^-$), soit le co-récepteur CD8 ($CD4^-/CD8^+$), soit les deux (DP ; $CD4^+/CD8^+$) ou bien aucun (DN ; $CD4^-/CD8^-$).

Toutes ces cellules ont un TCR commun, qui possède des domaines relativement conservés. Tout d'abord chez la souris avec la chaîne α de type $V\alpha14J\alpha18$, et la chaîne β dont la partie variable est de type $V\beta8.2$, $V\beta7$ ou $V\beta2$. Ces récepteurs reconnaissent des antigènes de type glycolipidiques, présentés exclusivement par la molécule CD1d. L'équivalent chez l'homme est composé d'une chaîne α de type $V\alpha24-J\alpha18$, et une chaîne β dont la partie variable est de type $V\beta11$. D'autres récepteurs sont également présents à la surface des NKTs, que l'on peut retrouver aussi bien chez les cellules NKs ou les cellules T conventionnelles. Certaines

présentent les récepteurs NK1.1 et CD94, que l'on trouve sur les cellules NKs en tant que récepteurs activateurs de la réponse cytotoxique, mais aussi le récepteur Ly-49 qui inhibe cette réponse. On trouve aussi les récepteurs CD44 et CD69, qui sont des marqueurs des cellules mémoires. A noter que toutes les souches de souris n'expriment pas les mêmes récepteurs sur les cellules NKTs. Par exemple, le récepteur NK1.1 n'est présent sur les cellules NKTs que chez la souche C57BL/6 (ou B6). Chez cette même souche, le thymus renferme des NKTs ayant une forte concentration de CD44 à leur surface. Un autre récepteur, le Ly6C, est absent des cellules NKTs présentes chez les souris de souche NOD (Non Obese Diabetic).^[21-23] Cela traduit le fait que plusieurs sous-types de cellules NKTs existent.^[5, 24]

C) Sous-types de cellules NKTs

1) Cellules iNKTs $V\alpha 14-J\alpha 18^+$ NK1.1⁺ CD1d dépendante (Type I)

Ces cellules existent chez la souris en deux sous-populations. Une $CD4^+/CD8^-$ et l'autre $CD4^-/CD8^-$, appelée double négatif (DN). L'élimination chez la souris des cellules $CD4^+$, a suffi dans un modèle tumoral à favoriser le rejet d'une tumeur.^[25] Cet effet est corrélé avec une très forte baisse de sécrétion d'interleukines de type 4 et 13 (IL-4 et IL-13), et une large sécrétion d'interféron γ (IFN- γ), permettant d'apporter une réponse anti-tumorale. Chez l'homme, il a été remarqué que les deux populations $CD4^-$ et $CD4^+$, sécrètent de fortes doses d'IFN- γ et de TNF- α , et que le type $CD4^+$ produit beaucoup plus d'IL-4, d'IL-2 et d'IL-13. La molécule CD8 est absente sur les cellules NKTs chez la souris, alors que chez l'homme, plus de 50% des cellules iNKTs l'expriment.^[26]

2) Cellules iNKTs $V\alpha 14-J\alpha 18^+$ NK1.1⁻ CD1d dépendante (Type I)

Ces cellules trouvées chez la souris et chez l'homme ($CD161^-$), produisent de fortes doses d'IL-4 et peu d'IFN- γ en comparaison des cellules NK1.1⁺ (ou $CD161^+$). Benlagha *et al.* et Pellici *et al.* ont montré qu'il semblerait que les cellules iNKTs $V\alpha 14-J\alpha 18^+$ NK1.1⁻ soit des précurseurs des cellules $V\alpha 14-J\alpha 18^+$ NK1.1⁺ au niveau du thymus, car une semaine après l'injection intra-thymique de souches NK1.1⁻, ils ont observé l'apparition des souches NK1.1⁺.^[27, 28] D'autre part, des études semblent montrer que les cellules iNKTs NK1.1⁺, après

avoir été stimulées par l' α -GalCer, limitent l'expression de leur TCR $\alpha\beta$ pendant 24 à 48 h et celle du marqueur NK1.1 pendant 12 jours.^[29, 30]

3) Cellules NKTs V α 14-J α 18^{-/-} CD1d dépendante (Type II)

Ces cellules ont été identifiées pour la première fois chez la souris, mais sont également présentes chez l'homme.^[31] Elles sont appelées NKT de type II, car elles ne reconnaissent pas le même ligand que les deux types de cellules précédemment citées. Les NKTs de type II reconnaissent des ligands de type sulfatide, lysosulfatide ou lysophosphatidylcholine. Leur TCR est également constitué de chaînes α et β mais leurs répertoires sont beaucoup plus variables. La chaîne α est majoritairement retrouvée avec une partie variable de type V α 3.2J α 9 ou V α 8, et la chaîne β avec une partie variable de type V β 8. Les cellules de type II jouent un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire, comme la suppression de l'auto-immunité ou la suppression de l'immunité tumorale.^[32, 33]

4) Cellules NKTs NK1.1⁺ CD1d indépendante

Ces cellules sont appelées « NKT-like cells ». Chez la souris, on trouve des cellules qui n'expriment pas le TCR V α 14-J α 18, et qui ne sont pas restreintes au CD1d. Elles sécrètent de très faibles quantités de cytokines.^[34, 35] Les cellules NKTs CD1d indépendante semblent être des populations assez hétérogènes, ce qui complique la connaissance de leur rôle dans l'organisme.

5) Autres cellules T semi-invariantes

En plus des populations citées précédemment, il existe d'autres types de cellules T semi-invariantes, comme les cellules appelées MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells).^[36] Elles sont restreintes à une molécule du CMH de classe I non classique, la molécule MR1. Elles sont présentes chez la souris et chez l'homme, et de manière similaire aux cellules NKTs de type I, elles possèdent un récepteur TCR avec une chaîne α invariante (V α 19J α 33 chez la souris, V α 7.2J α 33 chez l'homme). La chaîne β est plus variable, avec chez la souris des sous-unités V β 8 ou V β 6, chez l'homme V β 13 ou V β 2.

On compte également des cellules T restreintes à d'autres molécules de la famille du CD1, comme le CD1a, CD1b ou CD1c.^[37]

Plus récemment, une nouvelle population de cellules NKTs a été découverte chez la souris, classée comme ni de type I, ni de type II, mais également CD1d restreinte.^[38] Le TCR possède une chaîne α invariante (V α 10J α 50) alors que la chaîne β est variable (V β 8.1 ou V β 8.2 ; J β 1.1, J β 2.1, J β 2.2 ou J β 2.7). Ce nouveau type de NKTs, appelés V α 10 NKT, reconnaît les mêmes ligands que les cellules NKTs de type I, en produisant des taux de cytokines comparables. On note tout de même une spécificité pour le ligand α -GlcA-DAG (α -glucuronosyl-diacylglycérol ; issu de *Mycobacterium smegmatis*). Ces cellules sont présentes en grande quantité dans le foie, et en petite quantité dans la rate.

III) Les cellules dendritiques

Les DCs sont le deuxième type cellulaire intervenant dans la réponse immunitaire anti-tumorale, identifiée grâce au KRN7000. Ces cellules sont considérées comme les sentinelles du système immunitaire, car elles influent sur l'induction et la régulation de l'immunité innée et adaptative. Ainsi, les DCs immatures sont des cellules spécialisées dans le phénomène d'endocytose, et peuvent ingérer des cellules entières ou bien des antigènes présents sur des cellules vivantes.^[39] Ces entités vont être dégradées en peptides et être présentées au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) au sein des compartiments endosomaux. Le complexe formé va ensuite migrer à travers le cytoplasme cellulaire jusqu'à la surface membranaire, pour être présenté aux cellules T-CD4⁺.^[40] Pendant ce temps, la cellule dendritique migre depuis l'interface épithéliale vers les organes lymphoïdes secondaires. C'est ici que le peptide antigénique est présenté aux cellules T et que les DCs deviennent mûres, conduisant à la fin du processus d'endocytose.^[41] Cela conduit également à une très forte augmentation d'expression des CMH I et II, ainsi que des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (ou B7.1 et B7.2), qui permettent de stimuler les cellules T et d'induire leur prolifération *via* le ligand CD28.^[42] On trouve aussi l'augmentation de l'expression du récepteur CD40 (le ligand CD40-L est exprimé par les lymphocytes Th), ainsi que l'augmentation de la production de nombreuses cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-10, permettant la stimulation des cellules T.

On distingue deux types de DCs, à savoir les cellules myéloïdes (mDC) et les plasmocytoïdes (pDC) :

- Les cellules myéloïdes (mCD) regroupent plusieurs sous-unités de cellules dendritiques, comme les cellules de Langerhans (LCs), les cellules dendritiques dermiques (DDCs) ou encore les cellules dendritiques dérivant des monocytes (moDCs). Elles sont présentes dans le sang et dans les tissus périphériques, ce qui leur confère de part leur localisation, le nom de sentinelles de l'organisme.^[43] Une fois exposées à des IFN de type I (IFN- α par exemple), ces cellules induisent la différenciation des T-CD4⁺ naïves en T helper CD4⁺, permettant de promouvoir la réponse anticorps.^[44] Ces cellules expriment également des récepteurs de la famille des lectines de type C comme un récepteur Mannose (CD206) ou encore les récepteurs DC-SIGN (CD209) et DEC-205 (CD205). Ils reconnaissent tous des composés carbohydratés, avec présence soit de mannose ou de galactose.^[45] On trouve aussi le récepteur CD11c, qui s'active en présence d'un ligand bactérien de type lipopolysaccharidique (LPS). Tout ceci va conduire à la production d'interleukines dont la principale est l'IL-12, provoquant ainsi une réponse dirigée Th1.

- Les cellules plasmocytoïdes (pDC), appelées ainsi à cause de leur similarité cytologique avec les plasmocytes, sont également présentes dans le sang. Elles n'expriment pas les mêmes récepteurs que les mCDs, à savoir que les CD11c, récepteur Mannose ou DC-SIGN sont absents. On trouve des récepteurs de la famille des TLRs, comme les TLR 7 et 9. Ils sont impliqués dans la reconnaissance de particules d'ADN ou d'ARN d'origine virale, reconnaissance qui se fait dans l'endosome. Cela va conduire la cellule à exprimer de grandes quantités d'interféron de type I, comme l'IFN- α , qui sert notamment à différencier les cellules B naïves en plasmocytes,^[46] mais aussi à activer les mCDs.

La figure I.1 illustre la communication cellulaire se produisant lors de la présentation d'antigènes aux DCs.

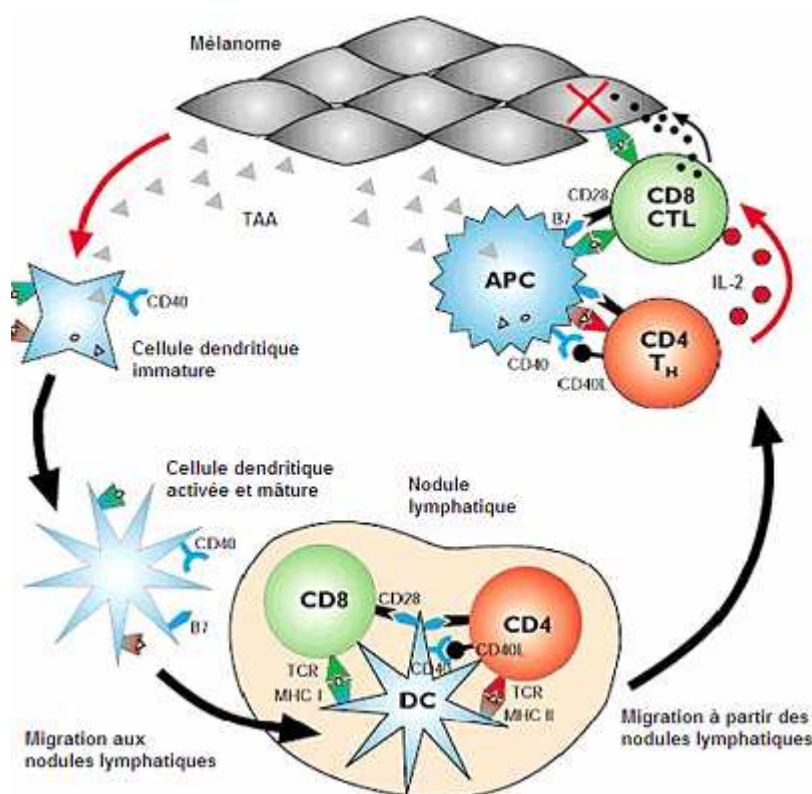


Figure I.1 : Schéma illustrant la communication cellulaire menant à la destruction de l'antigène, ici une cellule tumorale (d'après Smyth et al. 2001).^[47] Les particules antigéniques tumorales (TAAs) sont prises en charge par les DCs immatures. A ce moment, les DCs vont mûrir, et migrer vers les nodules lymphatiques où se trouvent les cellules T CD8 et CD4. Les DCs vont exprimer différentes molécules à leur surface (CMH I et II, CD80/CD86 et CD40), qui vont interagir avec les molécules se trouvant sur les cellules T (TCR, CD40-L et CD28). En réponse, les DCs sécrètent massivement de l'IL-12, qui stimule la prolifération des cellules Th-CD4 et Tc-CD8. Pour finir, on observe la lyse des cellules tumorales grâce à la sécrétion par les cellules Tc, de perforines et de granzymes. La première génère des pores dans la membrane cellulaire cible, la deuxième provoque l'apoptose cellulaire.

L'activation des cellules T est contrôlée par de nombreux processus de régulation positifs et négatifs. Certains des processus positifs (récepteur CD80/CD86 ou CD40), qui permettent de stimuler les cellules T, ont été présentés sur la figure I.1.

L'un des principaux processus négatifs, qui s'appelle l'anergie, est un phénomène qui concerne les cellules T et se traduit par l'inhibition de la réponse immunitaire. Ce phénomène sera développé ultérieurement.

IV) Le complexe CD1d

A) Généralités sur la famille de molécules du CD1

Les molécules de la famille du CD1 sont des molécules de types « CMH-I-like ». Elles comprennent des glycoprotéines qui sont exprimées à la surface de plusieurs cellules

présentatrices d'antigènes, comme les lymphocytes B, les macrophages ou les DCs. Les molécules de la famille CD1 sont hétérodimériques et ancrées à la surface de la membrane cellulaire. La chaîne lourde est constituée de trois domaines, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, associés de manière non-covalente à une chaîne légère, la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) qui est aussi associée à la chaîne α du CMH de classe I classique. Sur la figure I.2 est illustrée la molécule CD1d de souris avec son ligand.

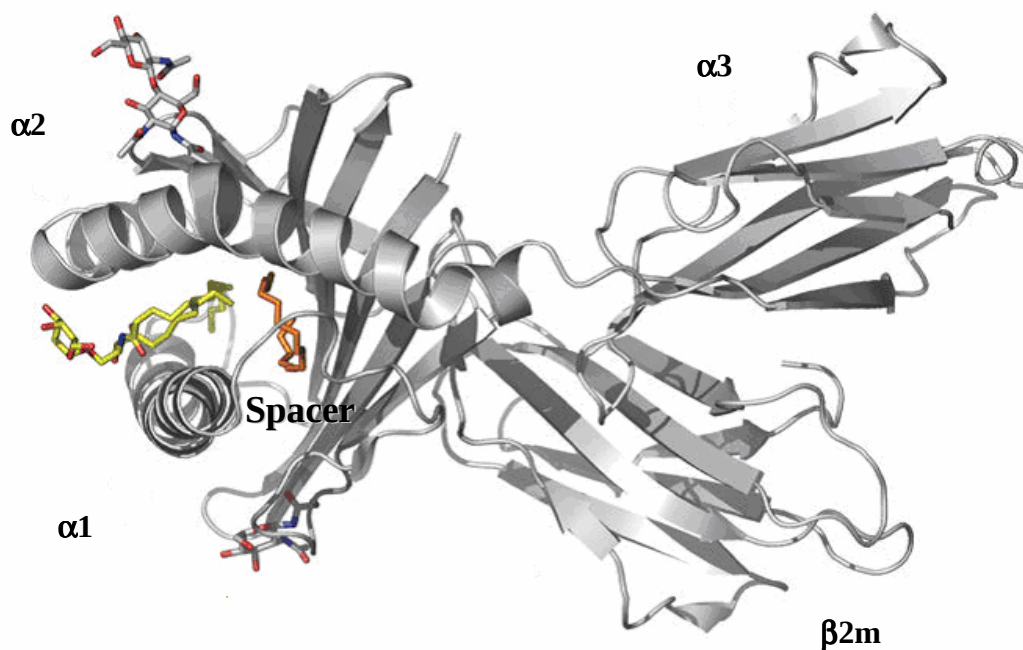


Figure I.2 : Complexe CD1d-ligand chez la souris (d'après Zajonc et al. 2005).^[48] Les rubans représentent le squelette du récepteur. Le ligand (en jaune) est accompagné d'un spacer (en orange) au sein du récepteur.

Le site de liaison du TCR est composé de régions hypervariables, comme les CDRs (Complementarity Determining Residues) qui sont des boucles rentrant en contact avec le complexe CD1d-ligand, et qui sont responsables de la liaison à l'antigène. Sur le CD1d, on trouve la présence d'une ouverture étroite entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, qui permet à la partie polaire du ligand d'être exposée à la surface du récepteur, et d'être reconnue par les CDRs du TCR.

Même si l'existence des molécules de la famille du CD1 est connue depuis 1979, ce n'est que lors des dix dernières années qu'un intérêt pour les fonctions de ces molécules est apparu.^[49] A l'inverse des molécules du CMH classiques qui reconnaissent des antigènes peptidiques, les molécules de la famille du CD1 reconnaissent des lipides ou des glycolipides, grâce à leurs poches qui présentent une grande hydrophobie. Cette famille de molécules est classée en trois

groupes. On trouve d'abord les CD1a, CD1b et CD1c qui forment le groupe 1, le CD1d formant le groupe 2. Ces deux groupes reconnaissent des antigènes de type lipidiques, mais le CD1d reconnaît en plus des ligands glycolipidiques. Le troisième groupe est formé par le récepteur CD1e, classé à part car il se trouve non pas à la surface des cellules, mais au niveau intracellulaire où il participe au transport de lipides.

A noter que seul l'homme possède cette famille de molécules du CD1, la souris n'ayant que le CD1d exprimé sous deux formes, CD1d1 et CD1d2.

Les molécules de la famille du CD1 sont formées dans la lumière du réticulum endoplasmique, par assemblage de la chaîne lourde α avec la chaîne β_2m . C'est également dans le réticulum qu'elles vont rencontrer les peptides du soi. La molécule est ensuite exprimée en surface, où elle va être internalisée pour retourner vers les compartiments endosomiques, afin d'échanger les molécules du soi contre les molécules du pathogène. Ceci est présenté dans la figure I.3.

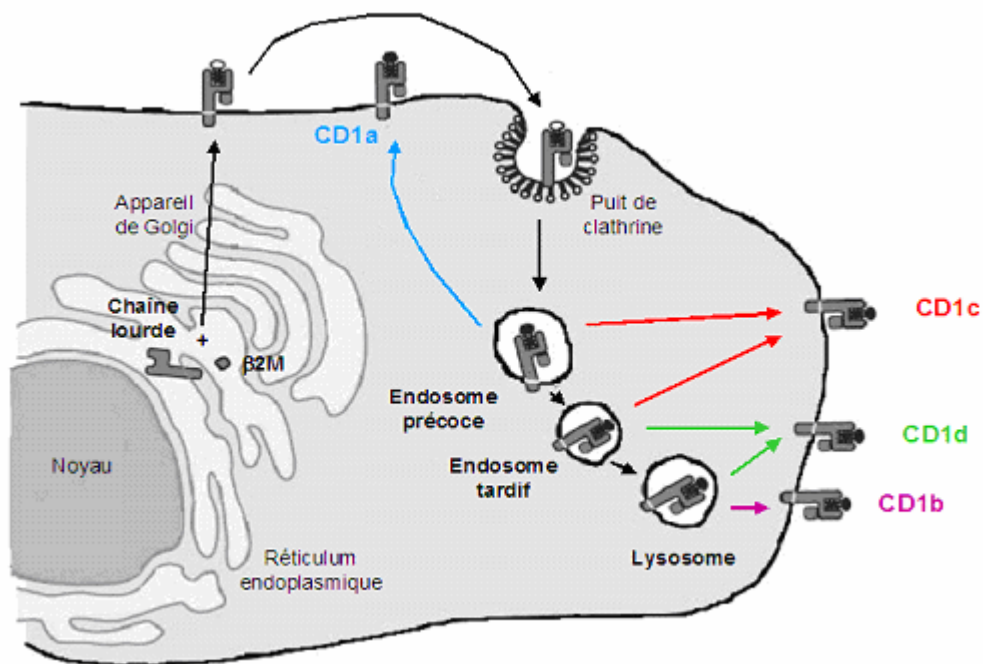


Figure I.3 : Trafic intracellulaire des molécules de la famille du CD1 (schéma réalisé d'après Brigl et al., 2004)^[50]. La chaîne lourde s'associe à la chaîne β_2m dans le réticulum endoplasmique. La molécule CD1 formée prend en charge un peptide du soi (petit cercle blanc), avant de l'échanger contre un lipide ou glycolipide pathogène (petit cercle noir). Les différents types de CD1 n'ont pas la même localisation dans la cellule. Ainsi, le CD1a se trouve seulement dans l'endosome précoce, le CD1c dans l'endosome précoce ou tardif, le CD1d dans l'endosome tardif ou le lysosome, et enfin le CD1b dans le lysosome.

B) La molécule CD1d

La molécule CD1d est exprimée sur les macrophages, les cellules B et les DCs. La présentation du peptide pathogène par le CD1d suit un processus précis, impliquant différentes molécules chaperonnes. Bendalac *et al.* ont établi un modèle global montrant le trafic cellulaire et la prise en charge d'un lipide pathogène par la molécule CD1d.^[13] La figure I.4 illustre ce modèle.

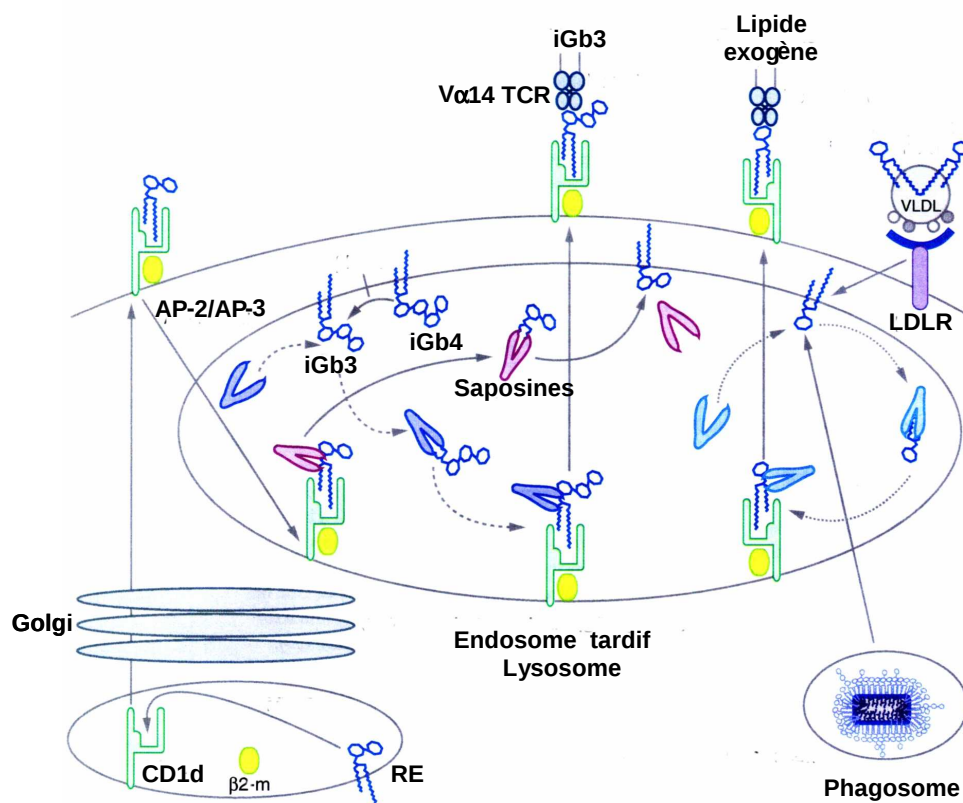


Figure I.4 : Prise en charge de l'antigène lipidique par la molécule CD1d.^[9] Après avoir été assemblé dans le réticulum et avoir pris en charge un lipide du soi, le CD1d est transporté à la surface cellulaire. La reconnaissance d'une base tyrosine sur la queue cytoplasmique du récepteur par la protéine adaptatrice AP-2, va conduire à l'internalisation du CD1d qui est ensuite dirigé dans les compartiments endosomaux.^[51] Le transfert entre les différents compartiments fait intervenir la protéine AP-3. Une fois dans l'endosome, la protéine de transfert de lipides, saposine B pour le CD1d, va échanger le lipide du soi contre le lipide pathogène, représenté ici par l'iGb4. La molécule du CD1d est ensuite à nouveau présentée à la surface cellulaire afin que le ligand puisse être reconnu par le TCR des cellules iNKTs.

C) Le complexe CD1d-cellule iNKT

Lorsque la molécule CD1d présente un ligand (lipidique ou glycolipidique) issu d'un pathogène, les cellules iNKTs vont reconnaître ce ligand et influencer sur la réponse immunitaire. Les iNKTs vont sécréter une large gamme de cytokines et de chemokines dans un laps de

temps de une à quatre heures, ce qui va amener à l'obtention de deux types de réponse. D'une part, une réponse appelée pro-Th1, conduisant à une stimulation pro-inflammatoire ou anti-tumorale, et d'autre part une réponse pro-Th2 conduisant à une stimulation immunomodulatrice ou humorale. Cette réponse est présentée sur la figure I.5 suivante.

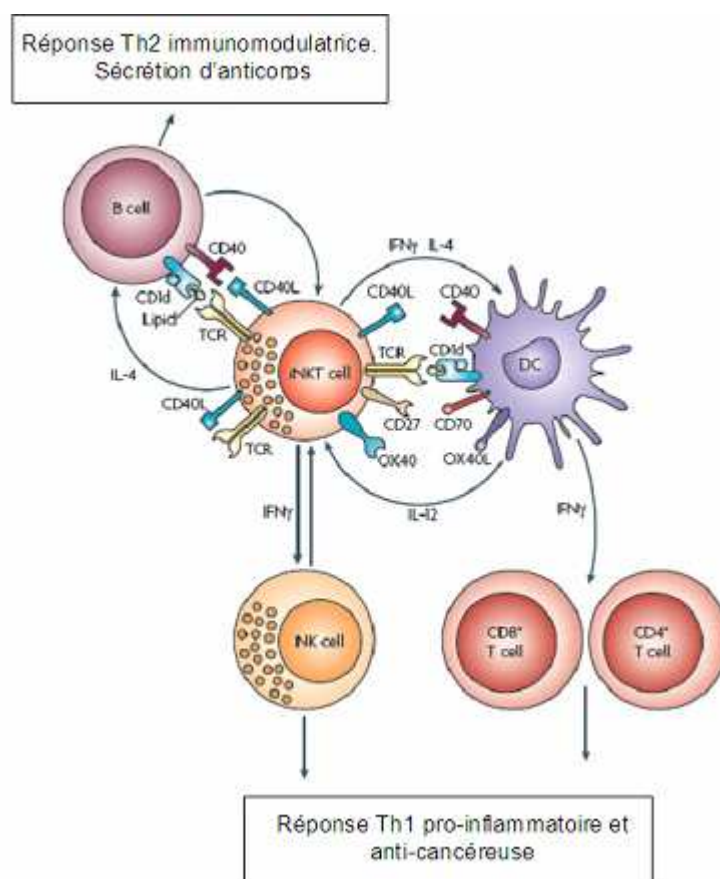


Figure I.5 : Cellules iNKTs stimulées par le complexe cellule dendritique-ligand (d'après Reddy et al. 2009).^[52]

La réponse induite par les cytokines pro-Th1 engendre la régulation d'infections d'ordre bactérien, parasitaire ou viral. Mais cette réponse est également impliquée dans des maladies auto-immunes, comme le diabète de type 1, le lupus, l'arthrite rhumatoïde ou l'asthme induit par des allergènes.

Les cytokines induisant une réponse pro-Th2 peuvent atténuer la réponse inflammatoire Th1, ce qui peut limiter l'induction de maladies auto-immunes. Néanmoins, les deux types de cytokines peuvent être sécrétés lors d'une stimulation, et ce phénomène est observé dans le cas de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE),^[53] qui est une maladie auto-immune activée par une réponse pro-Th1. Lorsque les cytokines de type Th2 (IL-4 par exemple) sont inhibées, la maladie se développe chez la souris. A l'inverse, lorsque les cytokines Th1 (IFN-γ par exemple) sont inhibées, la maladie régresse. Si les deux cytokines

sont produites, les deux réponses s'annulent. On constate alors qu'il peut être intéressant pour un composé dans le cadre d'un traitement de maladie, de provoquer soit une réponse Th1 soit une réponse Th2.

A noter que la sécrétion des cytokines pro-Th1 et pro-Th2, induite par la formation du complexe TCR/glycolipide/CD1d, peut être inhibée. En effet, une administration répétée de ligand fait apparaître un phénomène qui touche les cellules NKTs et que l'on nomme anergie, provoquant une très forte baisse du taux de sécrétion de cytokines.

V) Anergie des cellules NKTs

A) Généralités sur l'anergie des cellules T-CD4⁺

L'anergie est un processus biologique mis en place lors de réponses immunitaires, pour minimiser le risque d'auto-immunité. La régulation des cellules T est dite négative, car on observe un état de non-réponse immunitaire qui se traduit par une forte baisse d'expression des TCR et d'expression de l'IL-2.^[54] Ce phénomène a été observé pour la première fois dans les années 1980 dans le laboratoire de Ronald Schwartz,^[55] où il a été montré sur des cellules T-CD4⁺ mises en présence d'antigènes présentés par des APCs. La restimulation des cellules T a montré une prolifération très faible ainsi qu'un taux de sécrétion d'IL-2 très faible.

Les éléments mis en jeu dans l'anergie sont le récepteur TCR, ainsi que le récepteur de co-stimulation CD28. Dans le cas où seul le TCR est activé, on observe une augmentation de la régulation de la voie calcium/NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), qui va conduire à l'expression de facteurs de régulations négatives, comme Cbl-b, Itch, GRAIL ou DGK- α (figure I.6 A). Ils empêchent la traduction des gènes de l'IL-2 et de l'IL-2R (récepteur de l'IL-2), en agissant sur des éléments cellulaires.

Ainsi, en prenant l'exemple de DGK- α qui est une kinase (DiacylGlycerol Kinase- α), elle phosphoryle le DAG (DiAcylGlycerol) l'empêchant d'être impliqué dans l'expression du facteur de transcription AP-1 (figure I.6 B).^[56]

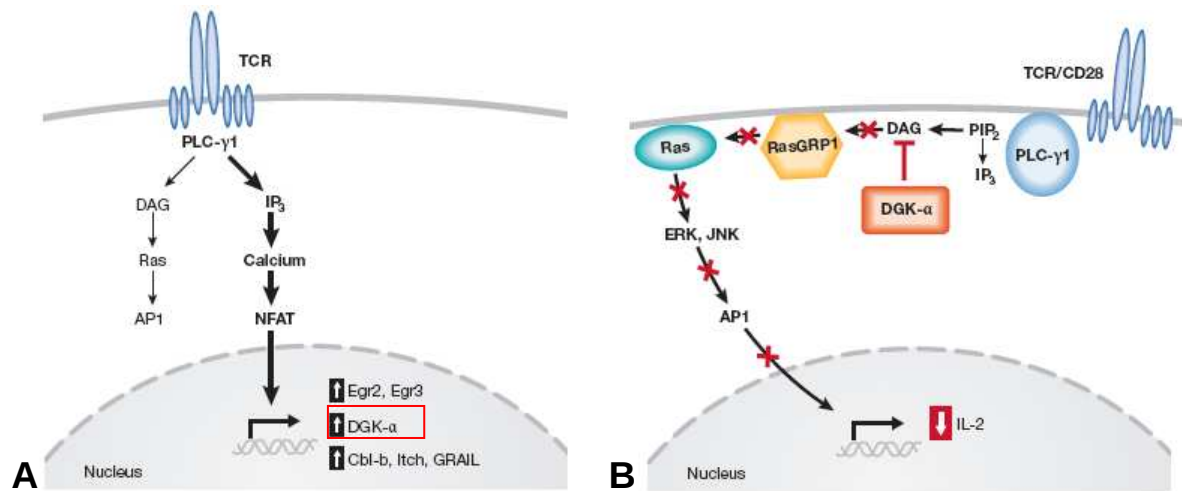


Figure I.6 : Voies de signalisation menant à l'anergie des cellules T (d'après Zheng et al.).^[57] **A.** Activation du TCR sans co-stimulation. Cette voie conduit à la surproduction de calcium, qui va entraîner l'expression des facteurs de régulation négatif comme Cbl-b, Itch ou DGK- α (encadré en rouge). **B.** Exemple de l'action du facteur DGK- α . Il va agir sur la phosphorylation de DAG, qui va conduire à l'inhibition de l'expression de l'IL-2.

Mais pour que l'anergie soit effective, il faut également que la protéine mTorC1 soit neutralisée, car comme le montre la figure I.7, elle participe à l'inhibition des facteurs de régulations négatives.^[58]

Dans le cas où le TCR et le CD28 sont activés simultanément, l'anergie n'est pas observée car la voie de recrutement du facteur de transcription AP-1 est opérationnelle pour la transcription du gène de l'IL-2.^[59] L'activation du CD28 permet surtout d'exprimer la protéine mTor, impliquée dans l'inhibition des facteurs DGK- α , Itch, etc (figure I.7).

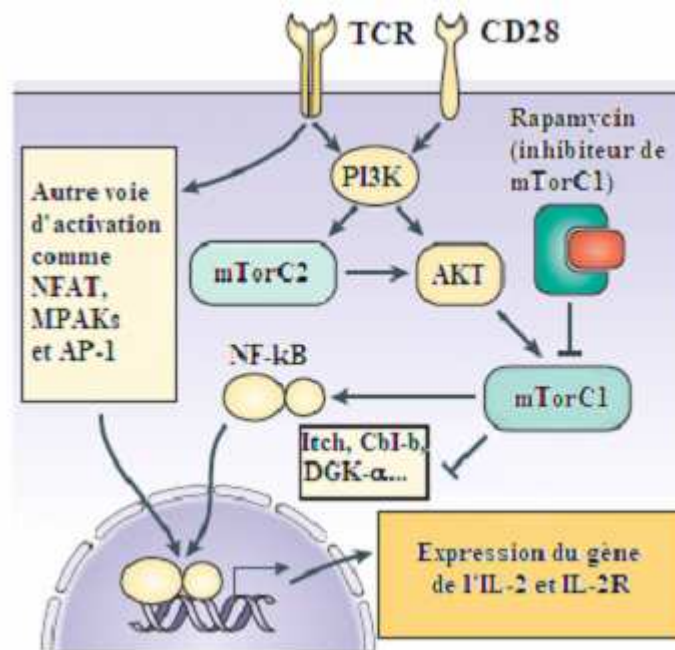


Figure I.7 : Expression du gène de l'IL-2 et IL-2R et inhibition des facteurs de transcription négatifs (d'après Thomson et al.).^[60] Dans le cas où le TCR et le CD28 sont stimulés simultanément, la protéine mTorC1 va inhiber l'expression des facteurs de transcriptions négatifs, et favoriser l'expression des facteurs positifs comme NF-κB. Ceci permettra la production d'IL-2 et l'expression du récepteur IL-2R.

Ce qui a été décrit jusqu'à présent concerne les cellules Th ou T-CD4⁺. Pour les cellules NKTs qui nous intéressent, on ne sait pas comment le signal de co-stimulation est impliqué dans l'activation des NKT, car le mécanisme mis en jeu dans l'anergie semble différent.

B) Anergie des cellules NKT

On considère que l'anergie apparaît lors de l'activation du TCR, sans signal de co-stimulation pour les T-CD4⁺. Pour les cellules NKTs, l'anergie apparaît après une stimulation du TCR par un ligand, avec des cellules NKTs inactives, rendant une deuxième stimulation inopérante.^[61] Pour l'heure l'hypothèse formulée pour cette anergie est qu'elle apparaît à cause d'un manque de spécificité dans la présentation du complexe CD1d-ligand aux cellules NKTs, avec une possible prise en charge du ligand par les cellules B.^[61]

Parekh *et al.*^[62] ont montré que le KRN7000 chargé sur des DCs purifiées, ne provoquait pas d'anergie. A l'inverse, le KRN7000 chargé sur des cellules B induit l'anergie des cellules NKT. La nature de la cellule présentatrice d'antigène (CPA) est donc importante, et le fait de pouvoir cibler la cellule dendritique grâce à des vecteurs (liposome par exemple), pourrait permettre d'éviter l'apparition de l'anergie.

D'ailleurs une autre hypothèse émise indique que la taille du vecteur utilisé peut également influencer sur l'anergie.^[63] Les petites nanoparticules (taille d'environ 200nm) étant reconnues par les cellules B, dendritiques et macrophages, alors que les particules de plus grandes tailles ne le sont plus par les cellules B, permettant ainsi d'éviter l'apparition de l'anergie.

VI) Ligands reconnus par les cellules iNKTs, via la molécule du CD1d

A) Découverte d'un ligand de CD1d

La molécule CD1d peut prendre en charge des ligands lipidiques ou glycolipidiques, qui sont reconnus par le TCR des iNKTs. Ainsi, les ligands peuvent provenir de différentes origines : de mammifères, de bactéries ou d'éponges marines. En 1994, une famille de molécules extraites d'une éponge marine, *Agelas Mauritanu*, est découverte comme ayant une activité anti-tumorale. Cette famille de molécules est appelée Agelasphin^[1] (AGL) dont voici deux exemples sur la figure I.8.

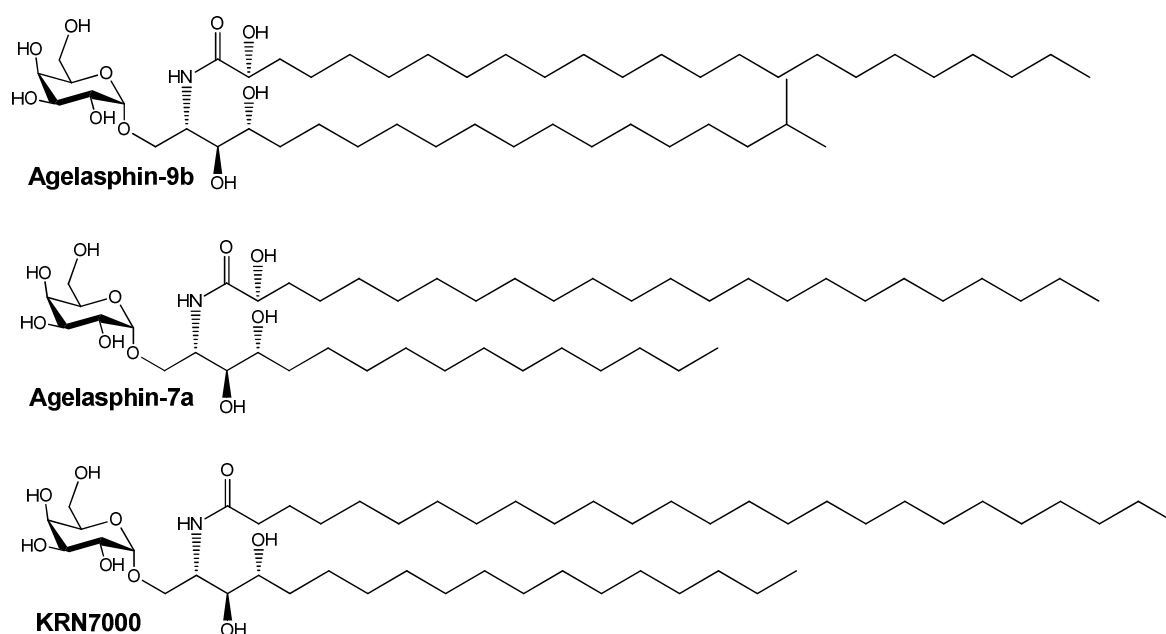


Figure I.8 : Agelasphin-9b et 7a issus d'*Agelas mauritanu* et KRN7000 synthétique

En 1995, l'équipe de Koezuka du Laboratoire de Recherche Pharmaceutique de Kirin Brewery, a validé l'activité anti-tumorale des AGLs contre des mélanomes inoculés chez la souris (souris B16).^[2, 64] Ayant identifié le motif α -Galactosyl-Céramide (α Gal-Cer) comme

l'élément redondant chez les AGLs, ils ont entrepris la synthèse de dérivés de cette famille de composés, qui les amena à l'obtention du KRN7000 (Figure I.8), constitué donc d'un α -galactose et d'une céramide constitué de deux chaînes grasses.

Ces molécules sont composées de deux parties : une partie osidique et une partie céramide, constituée d'une chaîne grasse et d'une sphingoïde (chaîne aliphatique saturée). La liaison glycosidique établit entre ces deux entités est de forme α pour la position anomérique, alors que chez les organismes dits supérieurs, la forme la plus abondante est la forme β . D'autre part, la partie céramide ne comporte pas de sphingosine (chaîne aliphatique contenant une insaturation), mais une sphingoïde. Dans les années 1990, les caractéristiques des AGLs (sucre de forme α et céramide comportant une sphingoïde), étaient à l'opposé de ce qui étaient connus dans le monde vivant à cet instant.

B) Ligands phospholipidiques endogènes

Il a été montré que les constituants membranaires des cellules peuvent aussi être des ligands du CD1d.^[65] Des phospholipides purifiés (extraits de cellules) ou de synthèse comme le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylglycérol (PG) ou la phosphatidyléthanolamine (PE), pourrait être reconnu par le CD1d. Plus récemment, il a été mis en évidence chez l'Homme, que la lysophosphatidylcholine (LPC) pouvait également être un ligand naturel des iNKTs.^[66] La LPC se retrouve à des taux élevés chez des patients présentant un myélome multiple et active les cellules iNKTs, mais faiblement en comparaison au KRN7000.

C) Ligands glycosphingolipidiques endogènes

La nature produit essentiellement des composés glycosylés dont la position anomérique est de forme β . On trouve ainsi chez les mammifères (souris, homme, etc...) deux molécules nommées iGb3 et Gb3, qui sont deux isomères constitués de trois sucres pour la partie osidique, et de deux chaînes grasses pour la céramide (figure I.9).

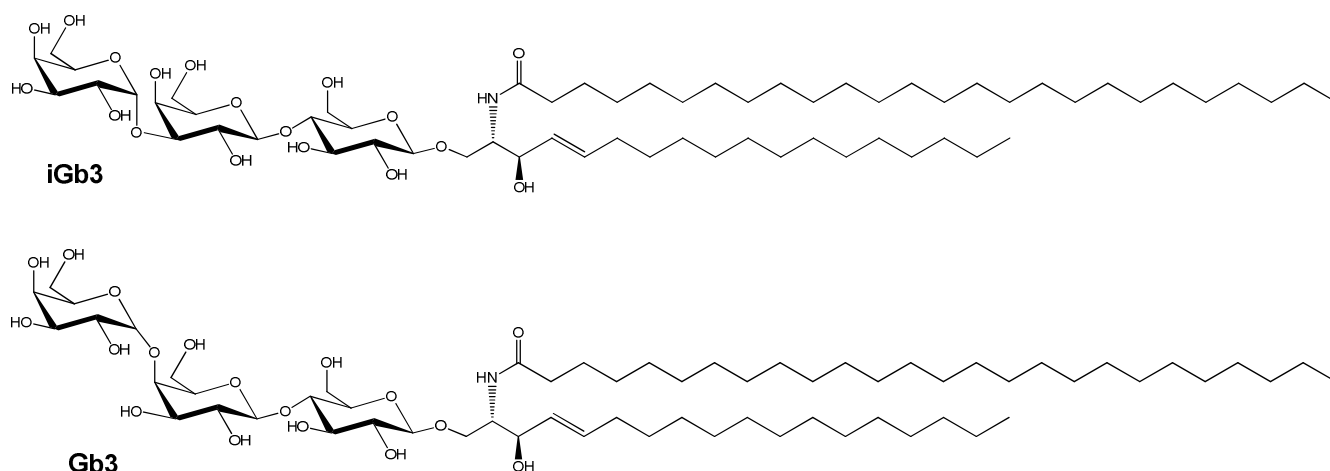


Figure I.9 : Présentation de l'iGb3 (isoglobotrihexosylceramide) et du Gb3 (globotrihexosylceramide).

Gb3 a été trouvé exprimé sur des tumeurs dans le cadre de plusieurs cancers, comme les adénomes colorectaux, le lymphome de Burkitt (prolifération des lymphocytes B), le cancer du sein ou le cancer des testicules.^[67]

L'origine de l'iGb3 n'est pas vraiment établie. Zhou *et al.*,^[68] stipulent que l'iGb3 active aussi bien les cellules iNKTs humaines que murines. Le problème est qu'il n'est pas évident de prouver l'existence de cette molécule chez l'homme. Chez la souris, on la trouve sous la forme d'iGb4 (avec 4 sucres) qui est dégradé en iGb3 par une enzyme lysosomale, la β -hexoaminidase B (β -HexB). Un déficit en enzyme a montré un impact sur le développement des cellules iNKTs, avec une forte réduction de celle-ci. La β -HexB coupe les groupements N-acetylgalactosamine (GalNAc), groupe que l'on retrouve sur l'iGb4 (schéma I.1).

Stanic *et al.* ont montré sur un modèle cellulaire murin, que le manque en β -D-glucosylceramide (enzyme impliquée dans la synthèse du β -glucosylceramide) ne permet pas d'activer les iNKTs, mais que ce déficit en enzyme n'impacte pas la présence de iNKTs dans l'organisme.^[69]

Li *et al.* ont montré que l'enzyme lysosomale α -galactosidase joue un rôle dans le contrôle de la génération d'antigènes lipidiques endogènes pour les cellules iNKTs. L'absence de cette enzyme facilite l'activation des iNKTs par la prise en charge de ligand de type α -galactose.^[70]

Sont représentées sur le schéma I.1 les différentes voies d'obtention supposées de l'iGb4, iGb3 ou Gb3.

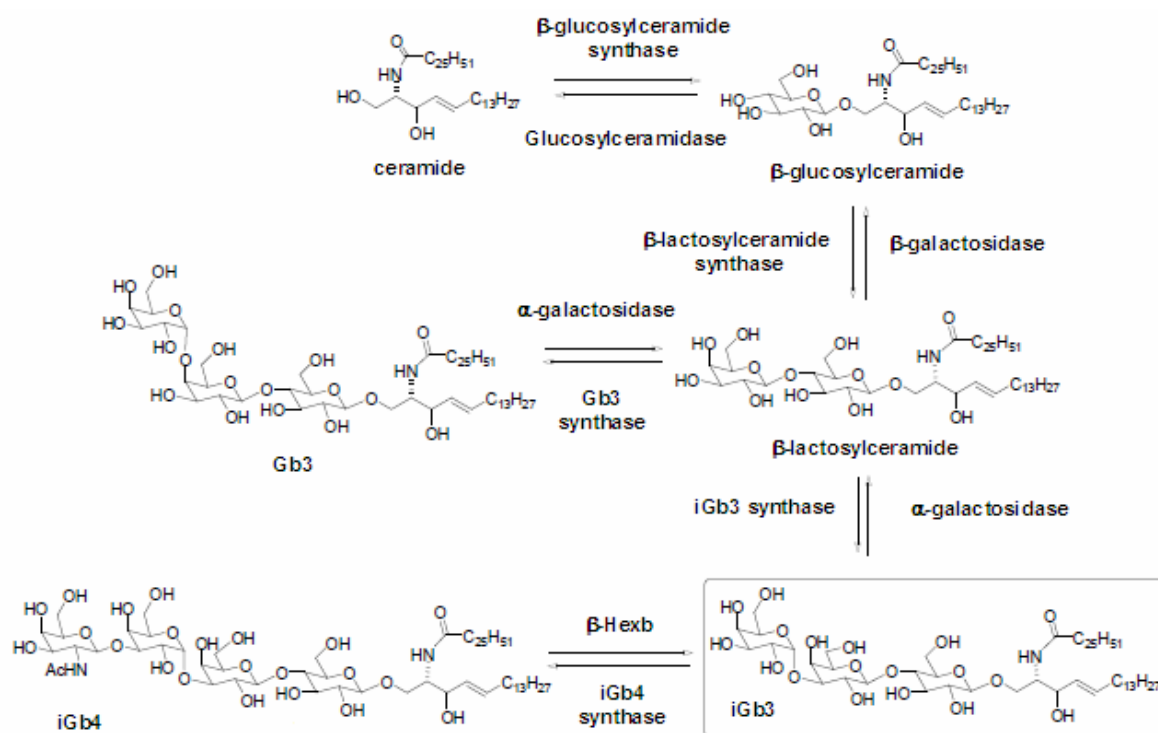


Schéma I.1 : Différentes voies d'obtention supposées de l'iGb4, iGb3 ou Gb3.^[68, 69]

Le test de stimulation des cellules iNKT par l'iGb3 ou l'iGb4 a montré que seul l'iGb3 peut les stimuler, et que l'iGb4, de part la présence du groupe GalNAc n'est pas actif.

Chez l'homme, l'iGb4 a été trouvé en très petite quantité dans le thymus.^[70] Ceci laisse supposer la présence chez l'homme d'une enzyme capable de réduire l'iGb4 en iGb3. Mais un autre schéma de synthèse de l'iGb3 a vu le jour par la découverte d'une enzyme présente dans le sang humain, la galactosyltransférase de groupe B (GTB), qui pourrait permettre la synthèse de l'iGb3 à partir de lactosylcéramide et d'UDP-Galp.^[67] Le résultat obtenu montre effectivement que l'enzyme GTB permet de synthétiser l'IGb3 *in vitro*, mais à des taux très faible.

Malgré la découverte de l'iGb3 comme antigène endogène, l'information sur les interactions du complexe CD1d-iGb3-TCR reste à clarifier.

D'autres molécules ont été identifiées comme activateurs potentiels des cellules iNKTs. On retrouve ainsi le ganglioside GD3, exprimé par les tumeurs de l'ectoderme, ou de sulfatides présents dans la myéline du système nerveux.^[71]

D) Ligands d'origines microbiennes

Plusieurs études ont montré que les cellules iNKTs reconnaissent une large gamme d'antigènes d'origine microbienne. Le premier découvert a été le PIM4 (tetramannosyl phosphatidylinositol) purifié chez *Mycobacterium bovis*.^[72] Ce composé a montré qu'il stimulait assez peu les cellules iNKTs, et induisait la production d'IFN- γ et peu ou pas d'IL-4. D'autres bactéries ont montré qu'elles sécrétaient des composés pouvant induire l'activation des iNKTs. On trouve ainsi *Borrelia burgdorferi* avec l' α MGalD (alpha-MonoGalactosyl-Diacylglycérol), les bactéries de la famille des *Sphingomonas* avec l' α -galacturonosyl et l' α -glycuronosyl-céramide (que l'on appelle GSL pour GlycoSphingoLipid) ou bien encore le protozoaire *Leishmania donovani* avec des lipophosphoglycane (LPG). Plus récemment, un lipopeptidophosphoglycane (EhLPPG) identifié dans la membrane d'*Entamoeba histolytica* a montré une activation des iNKTs.^[73, 74] Ci-dessous, sont représentés quelques exemples de molécules bactériennes reconnues par les iNKTs (Figure I.10).

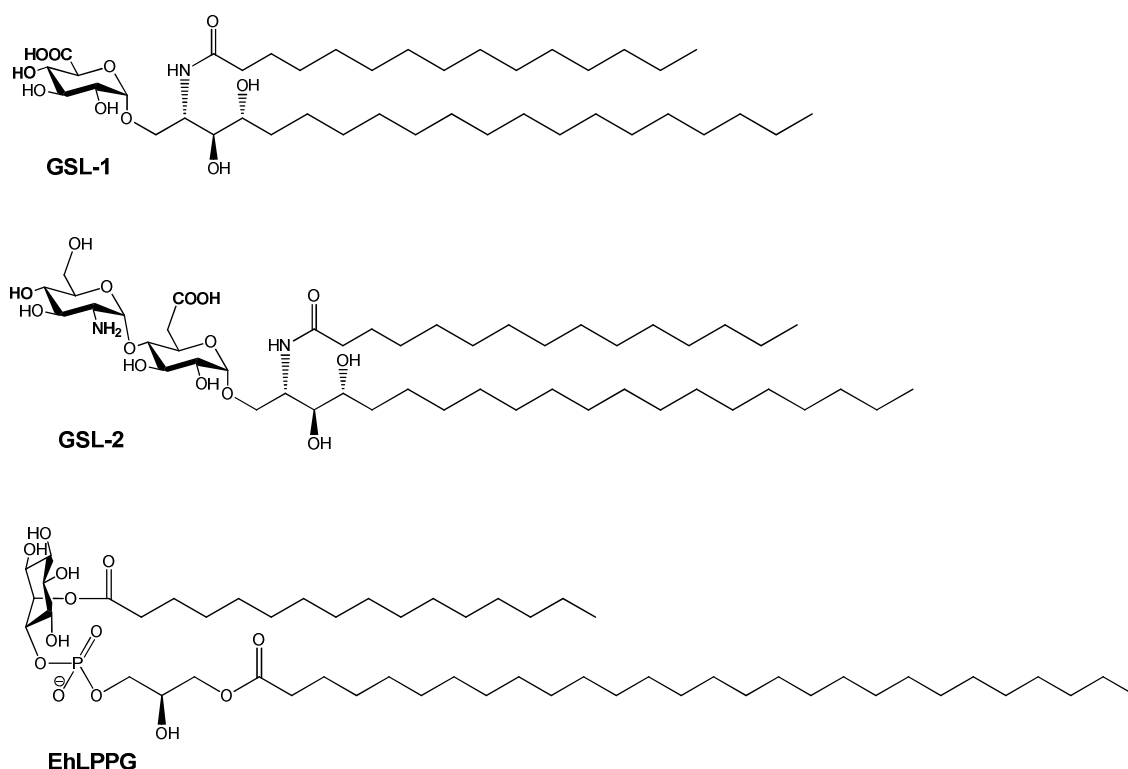


Figure I.10 : Présentation de ligands bactériens du CD1d, GSL-1, GSL-2 et EhLPPG.

VII) Relation structure-activité des α -Galactosylceramides

A) Généralités

Pour éviter l'extraction en masse des Agelasphins issus d'éponges marines, évitant ainsi leur disparition, et pour la recherche de la relation structure-activité de ces molécules, des analogues synthétiques ont été obtenus par différents laboratoires, avec notamment le KRN7000.

Le KRN7000 a montré qu'il possédait la capacité de proposer une réponse pro-Th1, donc favorable à une réponse anti-tumorale, mais aussi une réponse pro-Th2 qui est plutôt non favorable à une réponse anti-tumorale. On a donc une réponse immunitaire observée non optimale. A noter toutefois que le ratio de concentration de cytokines pro-Th1 sur cytokines pro-Th2 est supérieur à 1 (ratio IFN- γ /IL-4 >1).

Pour mieux comprendre quels sont les éléments présents sur le KRN7000 favorisant son activité, des structures cristallographiques du KRN7000 dans son site de liaison ont été publiées au milieu des années 2000. Ainsi les premières structures cristallographiques du CD1d avec le KRN7000 sont apparues en 2005, publiées par Koch *et al.*^[75] (fichier PDB : 1ZT4) et Zajonc *et al.*^[48] (fichier PDB : 1Z5L).

La molécule CD1d possède un domaine C terminal constitué essentiellement de feuilletts beta, alors que le domaine N terminal est plus complexe. Il contient deux hélices alpha qui agissent comme des « mâchoires » recouvrant les feuilletts beta. Ce domaine contient également deux poches hydrophobes, appelées A' et F' (ou C'), qui permettent la prise en charge du ligand et son orientation au sein du récepteur (figure I.11 A.). On observe donc que d'un côté, les chaînes aliphatiques s'insèrent parfaitement dans les poches hydrophobes, avec une chaîne dans la poche A', et une chaîne dans la poche F. D'un autre côté, la partie osidique est coincée entre deux hélices, émergeant du récepteur pour être présenté au TCR des cellules NKTs (figure I.11 B.). On note aussi la présence d'un espaceur dans la poche A', qui a été identifié comme étant un acide palmitique (C16 : 0)^[76] permettant de stabiliser la poche hydrophobe en l'absence de ligand. En présence de ligand, l'espaceur est déplacé (figure I.11 C.).

Une fois le ligand inséré, il est stabilisé par des liaisons hydrogènes qui se forment entre les acides aminés de CD1d, et les parties polaires du ligand. Dans le cas du KRN7000, il y a une liaison entre les hydroxyles en position 2 et 3 du galactose, et l'acide aspartique 153 (Asp153 ; hélice α 2). La partie céramide est stabilisée par plusieurs liaisons hydrogènes, à

commencer par une liaison entre le 2' NH de la liaison amide, et la thréonine 156 (Thr156 ; hélice $\alpha 2$). Les hydroxyles en position 3' et 4' font des liaisons avec respectivement les acides aminés arginine 79 (Arg79 ; hélice $\alpha 1$) et l'acide aspartique 80 (Asp80 ; hélice $\alpha 1$). La Thr156 participe également à une liaison avec l'oxygène anomérique (figure I.11 D.).

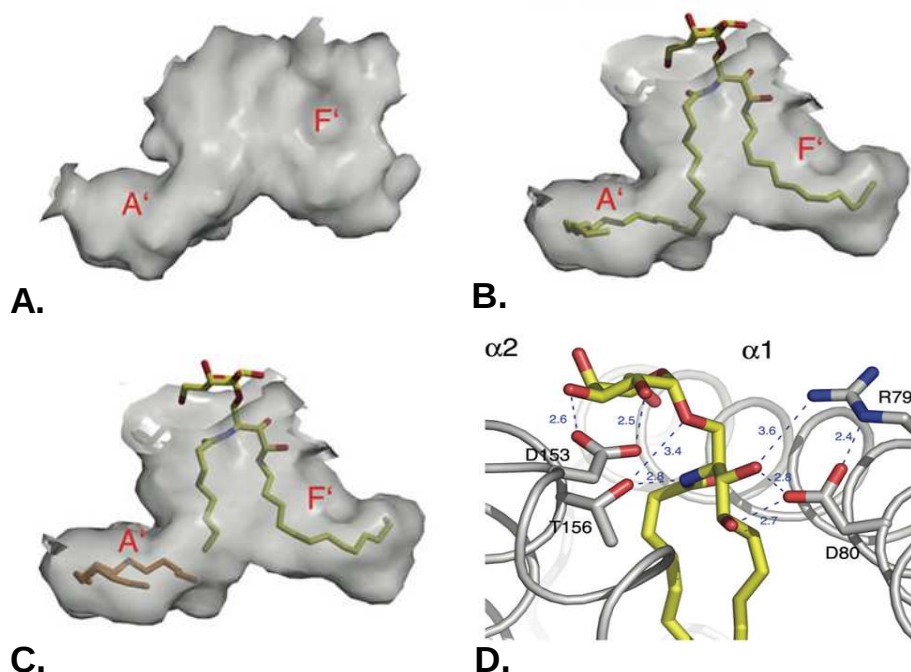


Figure I.11 : Structures cristallographiques du récepteur CD1d- α GalCer.^[48] **A.** Poches hydrophobes A' et F' de la molécule CD1d, sans ligand. **B.** Poches hydrophobes A' et F' en présence du KRN7000. On constate bien la présence du sucre en dehors du récepteur. **C.** Poches hydrophobes A' et F' en présence de ligand modifié, et de spacer (en orange). **D.** Liaisons hydrogènes entre les acides aminés du CD1d, et certains groupements hydroxyles du KRN7000 (les chiffres en bleu indiquent la distance en Å entre l'atome donneur et accepteur).

Ces données ont permis de montrer l'importance de certaines positions du ligand glycolipidique, avec par exemple l'hydroxyle en position 2 du sucre qui est important, à l'inverse des positions 4 et 6 qui ne sont pas impliquées dans des liaisons hydrogènes, et qui peuvent être substituées.

Grâce à ces études et également aux premiers analogues synthétisés juste après la découverte du KRN7000, il a été possible de déterminer quels sont les groupements pouvant être ou non modifiés, comme l'illustre la figure I.12.

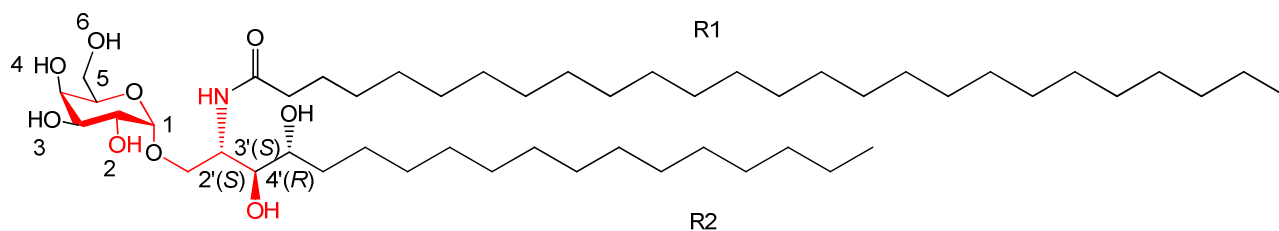


Figure I.12 : KRN7000. En rouge sont représentés les éléments nécessaires à l'obtention d'une activité (sucre de forme α -pyranosique avec l'OH en position 2, l'amine NH en 2' et l'OH en 3' portés tous deux par des carbones de configurations S). En noir, les éléments pouvant être modifiés pour améliorer ou maintenir l'activité envers les cellules NKTs.

Il est important de noter que la synthèse d'analogues du KRN7000 a débuté bien avant l'étude de la liaison KRN7000-CD1d (figure I.11). Ainsi la littérature a montré de nombreux analogues synthétisés en espérant pouvoir apporter une meilleure réponse anti-tumorale que le KRN7000, donc de favoriser la réponse pro-Th1. La découverte en 2005 des éléments importants (figure I.12), n'a fait qu'accentuer la synthèse d'analogues du KRN7000 avec toujours comme objectif d'obtenir une réponse immunitaire optimisée.

Nous allons ainsi voir dans les paragraphes suivants les analogues du KRN7000 les plus pertinents présents dans la littérature, ainsi que l'influence sur le ratio que peuvent avoir les changements opérés sur sa structure. De nombreuses positions peuvent être modifiées, que ce soit au niveau des chaînes grasses ou au niveau du sucre, et nous verrons que ces modifications jouent un rôle essentiel sur l'activité des cellules iNKTs et donc sur la sécrétion des cytokines pro-Th1 (IFN- γ) ou pro-Th2 (IL-4).

B) Modifications de la tête osidique

1) Modification du sucre

Il a été montré que le KRN ayant une partie osidique sous forme de furanose, n'était pas actif.^[77] Il est donc nécessaire de garder la forme pyranose.

Des études sur l'activation des cellules iNKTs ont montré que le changement de l' α -galactose par un groupement α -mannose n'induisait pas l'activation des cellules iNKTs. Le changement par un groupement α -glucose (Figure I.13 : molécule A ; α -Glucosyl-céramide (α -GlcCer)), induisait une activité plus faible que le KRN7000.^[20]

Plus récemment, Reddy *et al.* ont synthétisé un ensemble d'analogues non-glycosidiques.^[78] Il s'est avéré que le motif threitol (Figure I.13 : molécule B) est celui qui active le plus les

cellules iNKTs, mais moins fortement que le KRN7000. Veerapen *et al.* ont également modifié la structure du sucre en utilisant un groupement fucosyl (Figure I.13 : molécule C).^[79] L'activité de cette molécule s'est révélée intéressante car elle est assez proche de celle observée pour le KRN7000, mais d'autres analogues utilisant ce motif ne se sont pas montrés actifs.

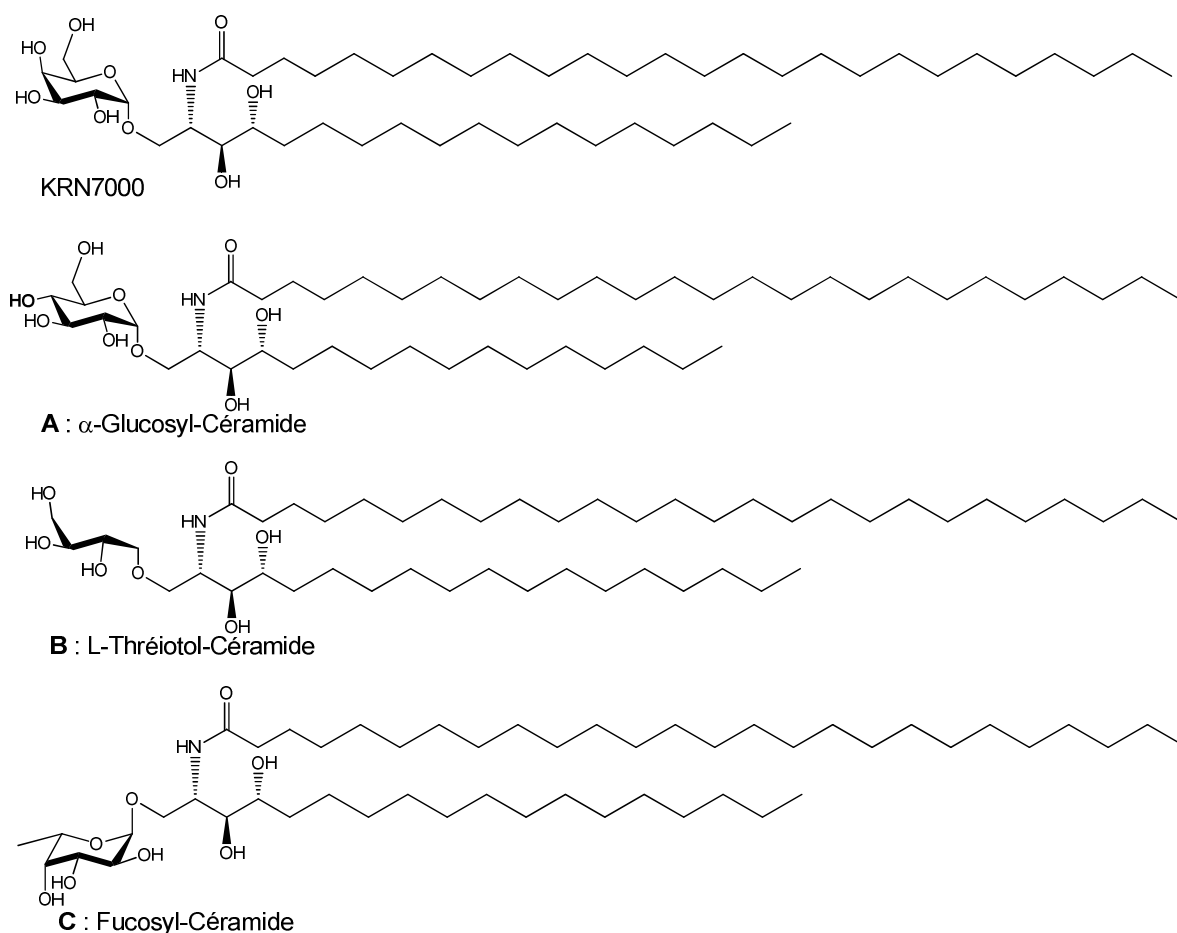


Figure II.13 : Analogues du KRN7000 avec modification de la tête osidique

Des modifications ont également été faites sur les différentes positions du sucre. La partie anomérique sera traitée dans un paragraphe spécifique. Nous nous concentrons donc en premier lieu sur les positions 2, 3, 4 et 6 du sucre.

2) Modification de la position 2

La position 2 a été modifiée, mais les analogues synthétisés n'ont montré que très peu d'effets sur l'activation des cellules iNKTs (figure I.14 : molécules D et E). Seule la molécule

E est active, à condition que la liaison osidique entre les deux sucres soit clivée par une enzyme.^[80, 81] L' α -Mannosyl-céramide (α -ManCer) testé par Kawano *et al.*^[20] n'a montré aucune activité.

Ceci montre que la position 2 est importante dans la reconnaissance du complexe CD1d-ligand par le TCR des cellules iNKTs et que sa modification n'est pas envisageable.

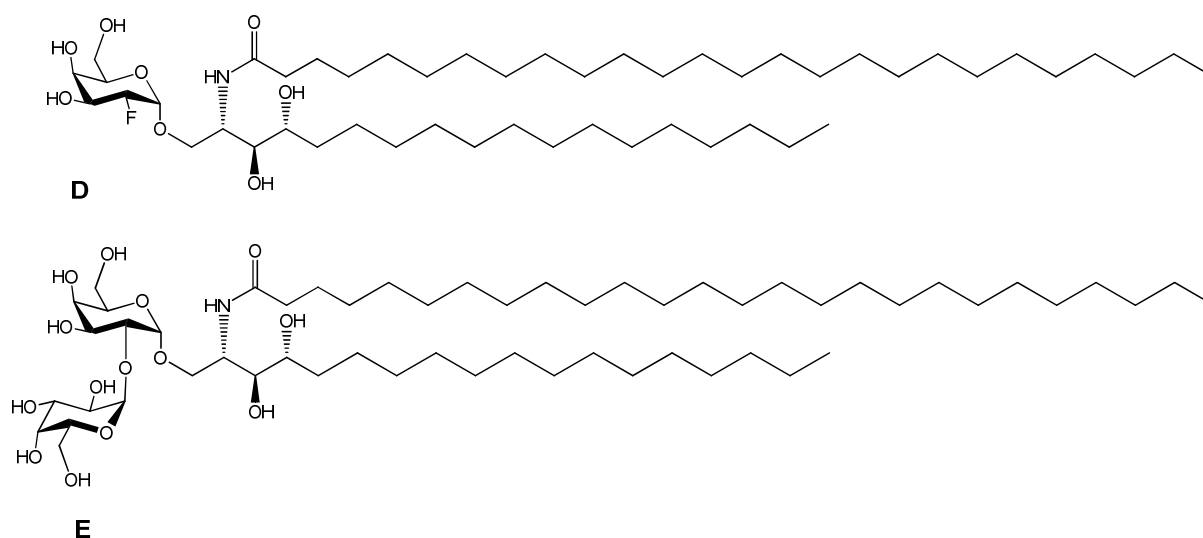


Figure I.14 : Analogues modifiés en position 2 du sucre.

3) Modification de la position 3

La position 3 a été modifiée la première fois par Kawano *et al.*^[20] en rajoutant un groupement β -galactofuranose, provoquant une activation des iNKTs trois fois moindre que le KRN7000. Raju *et al.*^[82] ont synthétisé deux analogues dont la position 3 hydroxyle est substituée soit par un hydrogène, soit par un fluor (figure I.15 : molécule F). Ces deux composés ont une activité assez proche du KRN7000.

Xia *et al.* ont synthétisé des molécules dont le 3-OH est remplacé soit par un azide, soit par une amine, soit par un acétamide.^[83] Mais tous ces composés ont montré une activité quasi nulle.

Le composé synthétisé par Xing *et al.*^[84] possède un groupe 3-O-sulfate (figure I.15 : molécule G) induisant un profil cytokinique Th1/Th2 similaire au KRN7000.

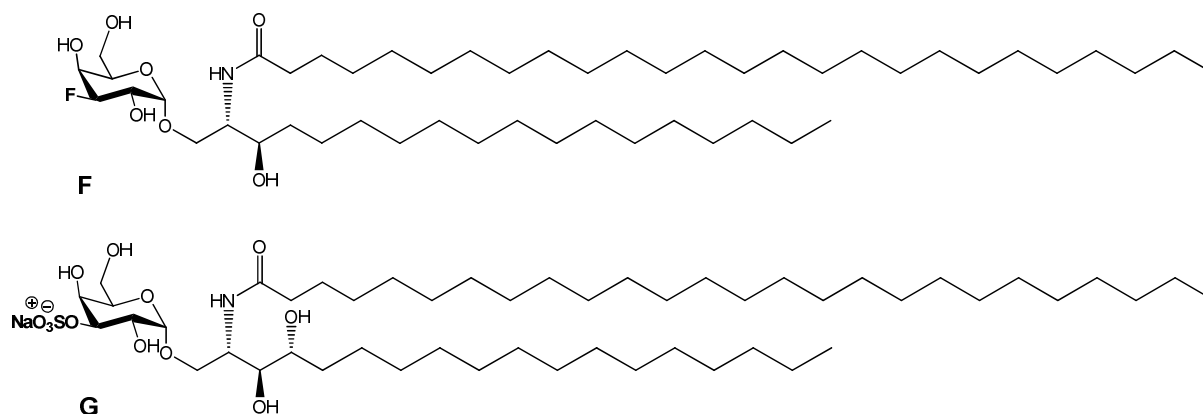


Figure I.15 : Analogues modifiés en position 3 du sucre.

4) Modification de la position 4

Xia *et al.*^[83] ont synthétisé un analogue ayant un groupement 4-OMe (figure I.16 : molécule H) qui induit nettement une sécrétion de cytokines de type Th2 par les cellules iNKTs. On parle alors de profil pro-Th2 de la molécule H. D'autres analogues modifiés en position 4 ont aussi montré un profil de type pro-Th2, mais dans tout les cas les quantités relevées sont très faibles par rapport au KRN7000.

Plus récemment, Zhang *et al.*^[85] ont synthétisé 3 analogues possédant un groupement aromatique en position 4. Ils ont montré que la molécule I (figure I.16) était plus active que le KRN7000, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. La molécule J a montré une activité inférieure au KRN7000 *in vitro*, mais un peu meilleure *in vivo*. Dans tout les cas, ces analogues ont montré un profil cytokinique quasi identique au KRN7000 *in vivo*, avec une réponse pro-Th2 dans les 4 premières heures (augmentation sensible de l'IL-4), puis une réponse pro-Th1 par la suite (baisse de l'IL-4 et augmentation de l'IFN- γ).

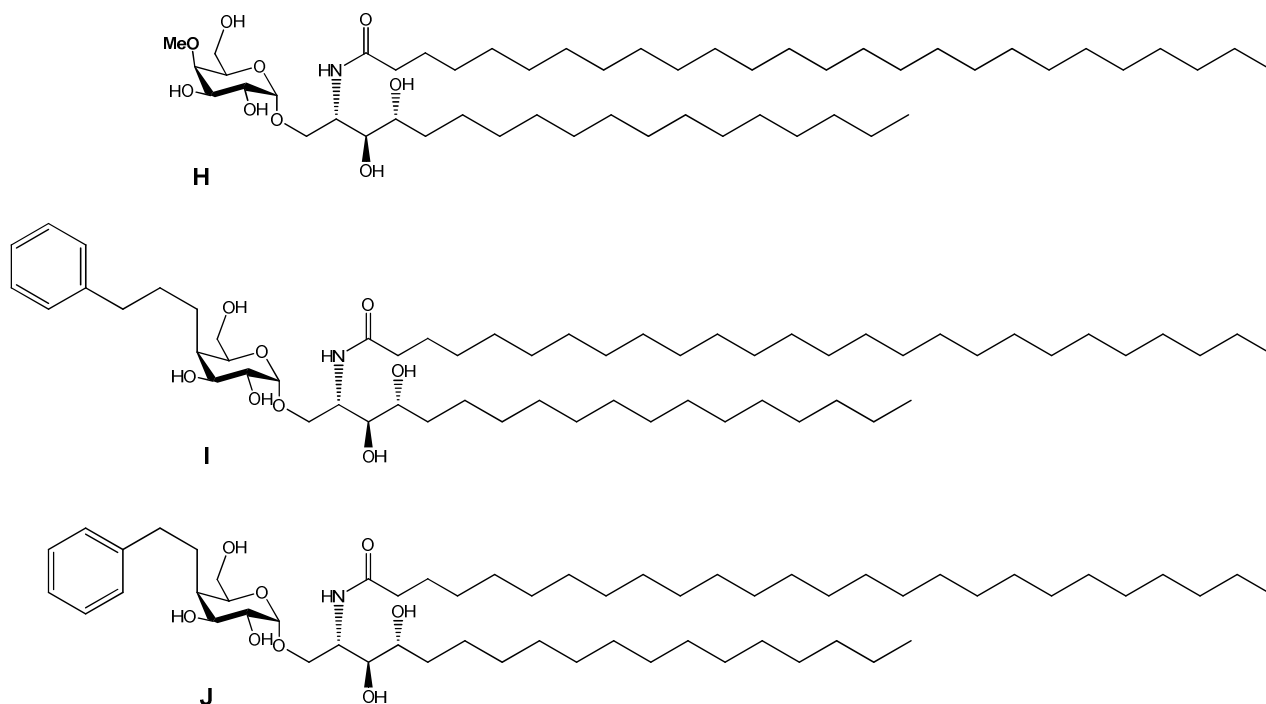


Figure I.16 : Analogues modifiés en position 4 du sucre.

5) Modification de la position 6

La position 6 est la position qui a subi le plus de modifications à ce jour. Parmi tous les analogues synthétisés, nous allons en voir 4 qui possèdent une activité remarquable. Le premier a été synthétisé par Ebensen *et al.*^[86], avec la modification de la position C6 en amine primaire. Ceci a permis de greffer un groupement PEG (Poly Ethylene Glycol) qui confère à ce composé un profil pro-Th2 *in vivo* (figure I.17 : molécule K).

Zhou *et al.*^[87] en 2002 ont synthétisé un ensemble de molécules portant soit des fluorophores, soit la biotine. Il s'est avéré que le composé avec la biotine (figure I.17 : molécule L) active les cellules iNKTs à un taux supérieur à celui du KRN7000.

Tashiro *et al.*^[88] en 2008 ont effectué la synthèse de composés, qui ont tous induit *in vivo* un taux de sécrétion d'IFN- γ nettement supérieur au KRN7000, 12h et 24h après injection. La molécule la plus performante du lot est constituée d'un groupement methoxy en C6 (figure I.17 : molécule M).

Trappeniers *et al.*^[89] ont entrepris en 2008 la synthèse de composés ayant un groupement aromatique en position C6. Ces groupements étaient plus ou moins fonctionnalisés par des éléments électro-attracteurs comme le fluor (F) ou le trichlorométhane (CCl₃). Tous ont induit *in vivo*, un profil pro-Th1 avec des doses d'IL-4 très basses par rapport au KRN7000.

Certaines de ces molécules ont induit des proliférations cytokiniques très intéressantes, ce qui a conduit Aspeslagh *et al.*^[90] à confirmer ces résultats *in vivo* en regardant notamment l'influence de ces molécules sur la prolifération tumorale pulmonaire. Lors de ces tests, c'est la molécule ayant un naphthalène en C6 (figure I.17 : molécule N) qui se montre la plus performante, avec une nette diminution chez la souris du nombre de tumeurs sur les poumons.

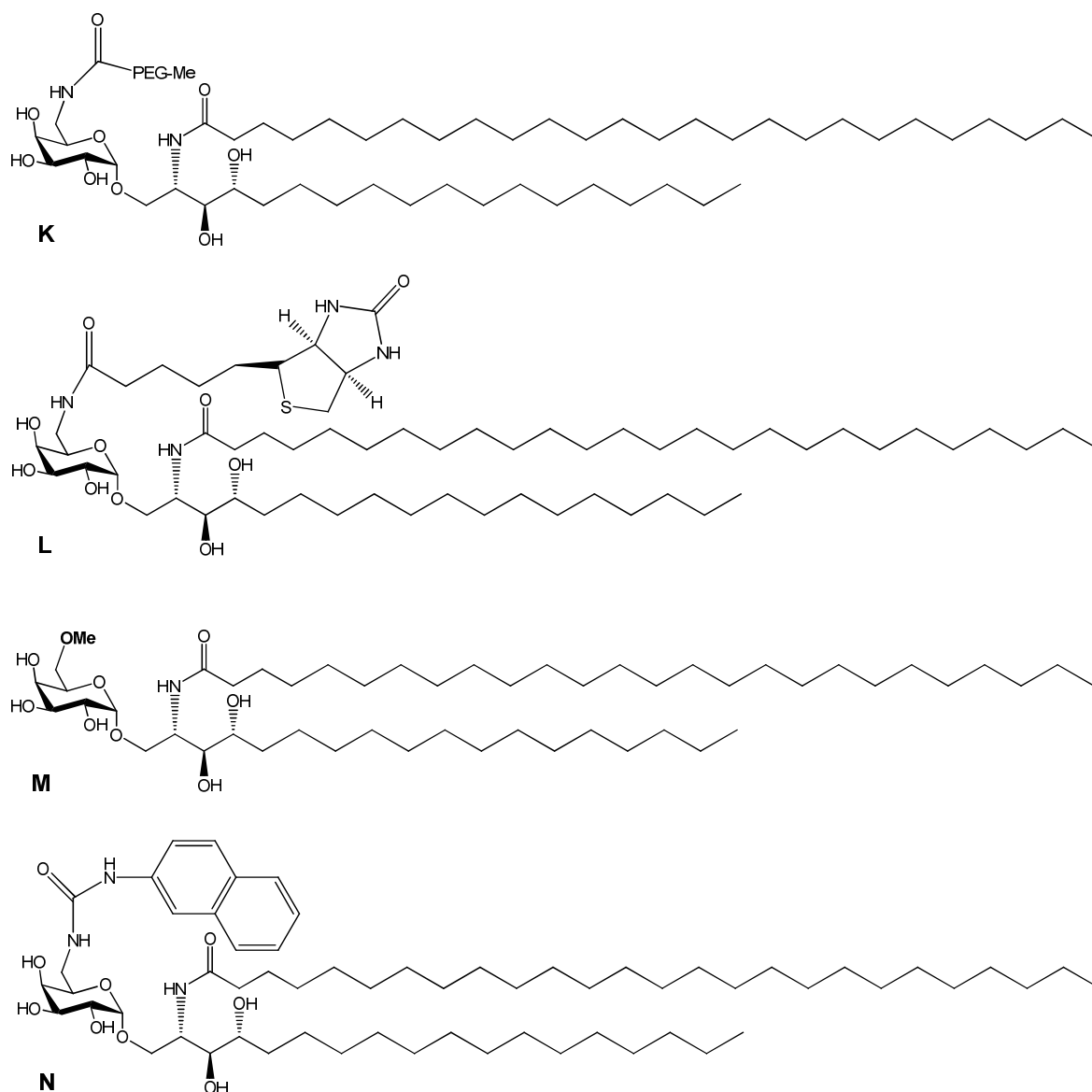


Figure I.17 : Analogues modifiés en C6

6) Modification de l'oxygène pyranosique

L'oxygène du cycle pyranose a également été modifié, et c'est principalement l'équipe de Kenji Mori qui synthétise des composés avec des modifications à ce niveau, en remplaçant l'oxygène du cycle pyranose par un groupement méthylène. Le premier composé fut synthétisé en 2007^[91] (figure I.18 : molécule O), et les résultats biologiques obtenus *in vivo* furent très intéressants. En effet, dans le cadre d'une réponse anti-tumorale, les propriétés pro-Th1 de la molécule se sont avérées nettement supérieures à celle du KRN7000, avec un taux de sécrétion d'IL-4 très faible, et un taux d'IFN- γ très élevé. Plus récemment, l'équipe de Kenji Mori a synthétisé des molécules avec toujours comme base le carbocycle, mais en modifiant cette fois-ci la position C5-C6. L'une de ces molécules a ainsi le carbone C6 qui est substitué par un alcool, porté donc par le carbone C5 (figure I.18 : molécule P).^[92] Comme précédemment, l'effet biologique induit par cette molécule est tout à fait remarquable dans le cadre d'une lutte anti-tumorale, avec un profil nettement pro-Th1. Ces molécules ont ainsi montré qu'elles sont des candidates potentielles pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

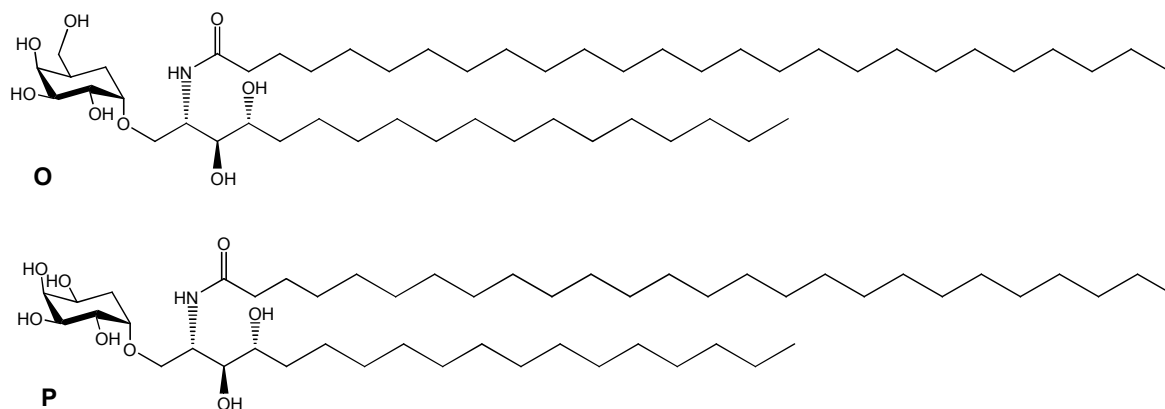


Figure I.18 : Analogues synthétisés par l'équipe de Kenji Mori.

C) Modification de la partie anomérique

Plusieurs anomères β ont été synthétisés par différents groupes. En 1997, l'équipe de Taniguchi a vérifié l'activité du composé β -GalCer qui s'est révélé être beaucoup moins réactif que l'anomère α sur la stimulation des iNKTs.^[20] A ce jour, les anomères β sont toujours considérés comme inactifs, car ils n'ont pas montré d'activité significative.

Néanmoins, Morshed *et al.* ont tout de même cherché à utiliser la forme β , et c'est ainsi qu'on l'utilise notamment dans le cas du traitement de maladie auto-immune comme le lupus. L'injection de la forme β -GalCer seule (figure I.19 : molécule Q) ne provoque presque aucune activité. Si on administre l' α -GalCer, on remarque que la forme β contrôle l'activité de la forme α (baisse du taux de cytokines Th1 responsable du lupus), conduisant à une amélioration de la maladie.^[93]

Une autre modification sur la position anomérique consiste en la substitution de l'oxygène par un méthylène, dans le but de limiter la dégradation *in vivo* par les glycosidases. En 2002 les premiers tests biologiques apparaissent, mettant en jeu une molécule appelée α -C-KRN et qui montre une très forte activité pro-Th1, en comparaison du KRN7000, contre les cellules de mélanomes B16.^[94] A partir de 2003, l'équipe de Moriya Tsuji a synthétisé l' α -C-GalCer (figure I.19 : molécule R) et a effectué des tests biologiques plus détaillés.^[95-97] On découvre ainsi que cette molécule a effectivement un fort potentiel pro-Th1, avec des doses d'IFN- γ produites supérieures à celles obtenues avec le KRN7000, et des doses d'IL-4 très largement inférieures. L' α -C-GalCer est ainsi 1000 fois plus protecteur contre la malaria que le KRN7000 et est aussi efficace à des doses 100 fois plus faible que le KRN7000. En effet, 1 ng d' α -C-GalCer est tout de suite très efficace, lorsque 10 ng de KRN7000 sont nécessaire pour une protection partielle et 100 ng pour une protection similaire au C-GalCer. Le ratio IFN- γ / IL-4 calculé est ainsi de 1,64 pour le KRN7000, et de 4,42 pour l' α -C-GalCer. Ce même groupe a montré de manière surprenante, que le dimère de CD1d humain chargé avec l' α -C-GalCer n'interagit quasiment pas avec les cellules iNKT humaines.^[89] La conséquence est évidemment un faible taux de sécrétion de cytokines par les iNKTs, mais il semblerait dans une étude récente, que ce soit les différences entre les TCRs invariants des iNKTs qui moduleraient l'activité de l' α -C-GalCer, plutôt que l'interaction avec la molécule CD1d.^[98] En 2006, Bittman *et al.*^[99] ont remis en cause l'activité du C-galactocéramide, en montrant que les doses de cytokines induites par la molécule étaient plus faibles que le KRN7000. Ils ont eux même synthétisé un analogue avec un méthylène en moins entre la position anomérique et la céramide (figure I.19 : molécule S), qui s'est avéré être très peu actif. Mais ils montrent tout de même que les ratios de l' α -C-GalCer et de la molécule S sont bien supérieurs au KRN7000. Cela montre tout de même le caractère prometteur de ces molécules dans le cadre d'une lutte anti-tumorale.

L'oxygène en position anomérique, a aussi été remplacé par un atome de soufre (figure I.19 : molécule T). Deux équipes ont ainsi synthétisé des analogues identiques, mais suivant des

protocoles différents.^[100, 101] L'utilisation de l'atome de soufre s'est justifiée par le fait que, comme l'analogue α -C-GalCer, la liaison S-osidique est plus stable car moins sensible aux coupures enzymatiques. Dans une étude menée par Chang *et al.*^[102] sur la stimulation des cellules iNKTs par différents analogues d' α -GalCer, l' α -S-GalCer s'est montré très peu actif, ce qui laissait penser que ce type d'analogues n'avait que très peu d'intérêt. Mais une étude plus récente a montré une activité comparable au KRN7000 sur l'activation des cellules iNKTs humaines *in vitro*.^[103] L' α -S-GalCer induit aussi de manière équivalente la maturation des DCs en présence de cellules iNKTs, et donc permet la sécrétion de cytokines. Par contre, les cellules iNKTs de souris n'ont pas montré de signes d'activation, ce qui confirme les résultats de Chang *et al.* sur ce point. Néanmoins, vu les résultats, l' α -S-GalCer pourrait être un futur candidat dans le cadre d'une stimulation immunitaire chez l'Homme.

La molécule U (figure I.19 : molécule U) a été synthétisée récemment.^[104] Elle possède une modification sur la partie anomérique, avec un NH à la place de l'O, mais également un méthylène qui remplace l'O pyranosique. Les équipes de Castano et Llebaria ont synthétisé deux analogues possédant un cycle « aminocyclitol », mais seule la molécule U a montré un intérêt. Les résultats des tests *in vitro* ne se sont pas révélés très intéressants, car les taux de cytokines IFN- γ et IL-4 sont très bas et nettement inférieurs au KRN 7000. Les tests *in vivo* ont montré un profil nettement plus intéressant. Des mesures de cytokines ont été effectuées à 2 et 24h. La molécule U induit un taux de sécrétion d'IFN- γ quasi nulle à 2h, et un taux d'IL-4 très faible. A 24h, le taux d'IL-4 a encore baissé, pour être quasi nul, alors que le taux d'IFN- γ est presque deux fois plus important que pour le KRN7000. On observe donc que la molécule U induit un profil pro-Th1 beaucoup plus important que le KRN7000. Les auteurs n'expliquent pas vraiment pourquoi les résultats *in vitro* et *in vivo* sont tellement opposés, mais ils supposent que l'absence d'oxygène anomérique permet à la molécule U d'avoir un temps de demi-vie plus long dans l'organisme. Les glycosidases ne peuvent le dégrader, ce qui confère à cette molécule une plus grande biodisponibilité *in vivo*.

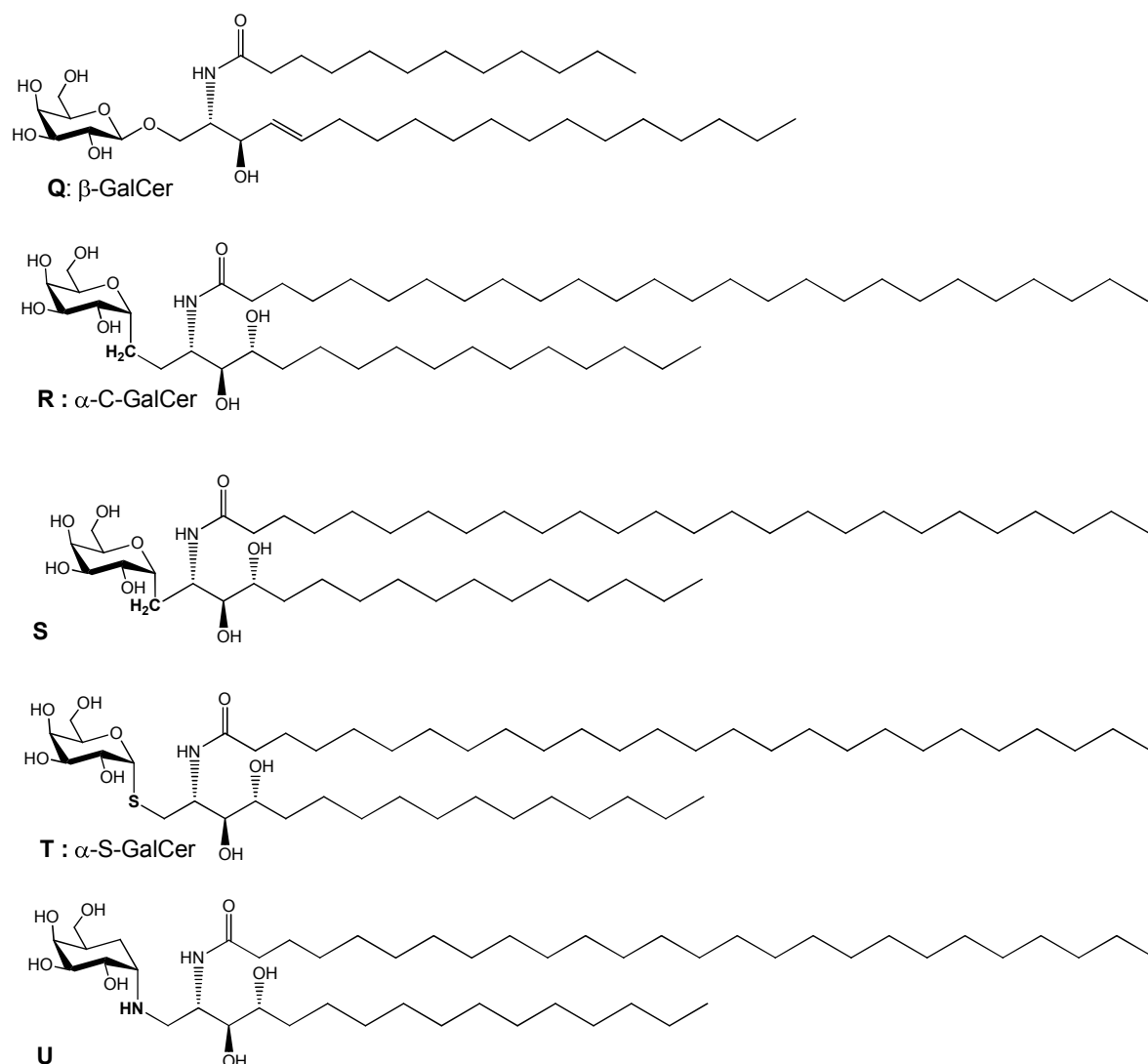


Figure I.19 : Analogues du KRN7000 avec modification de la position anomérique.

D) Modification de la partie polaire de la céramide

C'est une position qui est peu étudiée dans la littérature, mais dont la modification a tout de même pu montrer des effets biologiques intéressants. En 2007, Lee *et al.* ont synthétisé un composé avec un groupement triazole en lieu et place de la fonction 2'NH (figure I.20 : molécule V). Les analogues synthétisés ont tous induit un profil pro-Th2.^[105]

En 2008, Fuhshuku *et al.*^[106] ont synthétisé différents analogues, dont deux avec un cycle azetidine et pyrrolidine, à la place du 2'NH. Il s'avère que le composé avec l'azetidine (figure I.20 : molécule W) induit un profil pro-Th2, alors que celui avec la pyrrolidine induit un profil pro-Th1 mais avec des doses cytokiniques beaucoup plus faibles que pour le KRN7000.

En 2010, un groupe a remplacé la liaison amide en 2' soit par des liaisons ester, soit par des liaisons éther.^[107] Différents analogues ont ainsi été synthétisés, mais peu ont montré une activité significative. La molécule la plus pertinente étant la molécule X (figure I.20 : molécule X), qui possède en plus un méthoxy sur la position C6. Elle induit un taux d'IFN- γ très faible, mais un taux d'IL-4 comparable au KRN7000, conférant à cette molécule un profil d'activation plutôt pro-Th2.

Les analogues présentés ici ont tous montré un profil Th2, indiquant que la position 2'NH a une influence sur la balance cytokinique.

Trappeniers *et al.* ont également changé cette partie polaire de la céramide, en modifiant soit la position 3', soit la 4'. Ils y ont inséré une amine primaire en remplacement de l'hydroxyle (figure I.20 : molécule Y).^[108] L'impact des modifications apportées aux molécules sur l'activité cytokinique induite n'est pas négligeable, car les taux d'IFN- γ et d'IL-4 sont nettement inférieurs à ceux retrouvés pour le KRN7000. On peut tout de même constater que les molécules ayant l'amine en position 3', sont beaucoup moins actives que les molécules modifiées en 4'. Ceci révèle que la position 3' est une position très importante dans la reconnaissance du ligand par le TCR des iNKTs, alors que la position 4' l'est un peu moins. On peut constater cela sur les ligands dits « endogènes » de la molécule du CD1d.

Les structures cristallographiques montrent que la position 4'OH participe tout de même à une liaison hydrogène avec l'acide aspartique 80 du CD1d, participant ainsi au bon positionnement du ligand pour une meilleure reconnaissance par le TCR.

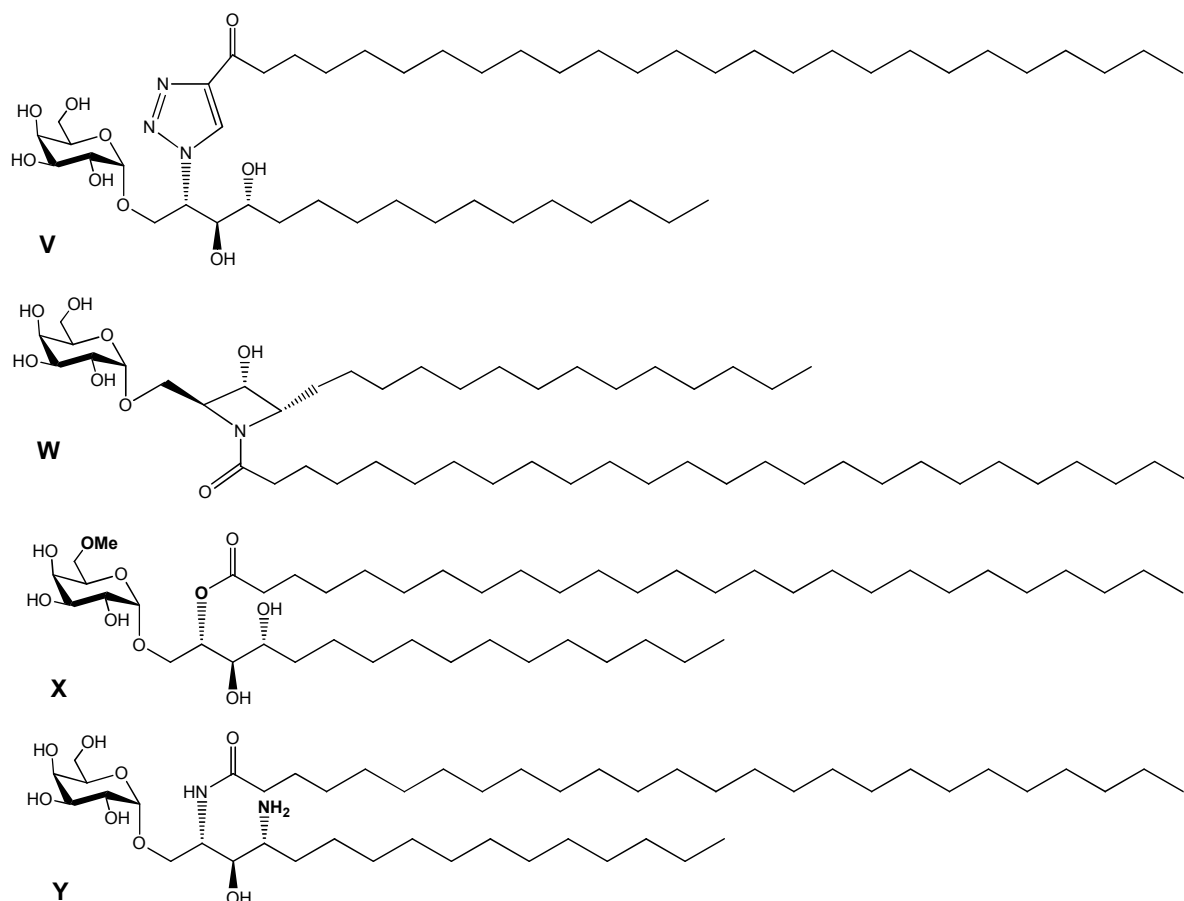


Figure I.20 : Molécules dont la partie polaire de la céramide est modifiée.

E) Modification de la partie hydrophobe de la céramide ; chaînes grasses R1 et R2

Cette partie est la composante du KRN qui a subi le plus de modifications. Les variations qui y ont été effectuées ont permis d'élaborer des composés induisant un profil pro-Th1 ou pro-Th2. Nous allons donc diviser cette partie en deux, avec d'une part les modifications effectuées sur la chaîne aliphatique R1, et d'autre part, celles effectuées sur la chaîne aliphatique R2.

1) Modification de la chaîne aliphatique R1

L'une des premières modifications effectuées sur la chaîne R1, a consisté au raccourcissement de celle-ci. Goff *et al.*^[109] ont synthétisé différents analogues, dont un exemple est illustré sur la figure I.21 (figure I.21 : molécule R1-A). Les tests qui ont suivi ont montré un net potentiel pro-Th2 de la plupart des molécules, avec un ratio IFN- γ / IL-4 plus bas que pour le KRN7000. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces composés ont une affinité

moins importante dans le récepteur CD1d que le KRN7000, conduisant à une stimulation des iNKTs plus modérée.

Par la suite, sont apparues dans la littérature des molécules ayant une ou plusieurs insaturations. Yu *et al.*,^[110] et plus récemment Velmourougane *et al.*,^[111] ont synthétisé des analogues qui induisent des profils quasi exclusivement pro-Th2. Le taux d'IL-4 étant assez proche de celui induit par le KRN7000, mais le taux d'IFN- γ est nettement plus bas, voire inexistant dans certains cas. Les molécules R1-B et R1-C possèdent deux insaturations (figure I.21 : molécule R1-B et R1-C) et sont les molécules ayant le potentiel pro-Th2 le plus marqué. Plusieurs équipes ont également synthétisé des composés avec un groupement aromatique en position terminale de la chaîne grasse R1. En 2006, Fujio *et al.*^[112] ont synthétisé une série dont la chaîne R1 variait en longueur et se terminait par un groupement phényle. En 2007, Chang *et al.*^[113] ont publié les tests biologiques de ces analogues, montrant majoritairement des profils pro-Th1 (figure I.21 : molécule R1-D). En 2008, Liang *et al.*^[114] ont synthétisé des composés reprenant le principe de Fujio et Chang (chaîne R1 raccourcie plus un phényle en bout de chaîne) mais en fonctionnalisant le groupement phényle en *para*, par des groupements comme le fluor, un méthoxy ou du trifluorométhane. Les études biologiques ont montré que les molécules fonctionnalisées induisaient un ratio IFN- γ / IL-4 encore plus élevé que les composés non fonctionnalisés. La molécule R1-E l'illustre parfaitement (figure I.21 : molécule R1-E), avec l'induction d'un ratio IFN- γ / IL-4 supérieur de 1 point par rapport à celui induit par son homologue non fluoré.

En 2010, Park *et al.* ont synthétisé plusieurs lots de composés, dont les deux chaînes aliphatiques sont raccourcies et fonctionnalisées par un groupement phényle terminal.^[115] Les tests effectués sur ces molécules, ont montré que le cumul de ces deux modifications empêche toute activation des cellules NKTs.

En 2011, Lee *et al.* ont synthétisé deux analogues avec une chaîne aliphatique supplémentaire, greffée sur la chaîne R1 (figure I.21 : molécule R1-F).^[116] Ces composés induisent un profil comparable au KRN7000, avec la production de taux de cytokines IFN- γ et IL-4 quasi identiques.

Pour résumer, le raccourcissement de la chaîne aliphatique R1, ou bien la présence d'une ou plusieurs insaturations, va conduire à une réponse pro-Th2. Si la chaîne se trouve raccourcie mais en présence d'un groupement aromatique comme un phényle, la réponse sera orientée pro-Th1. Il est néanmoins possible d'augmenter le ratio IFN- γ / IL-4, par l'ajout d'éléments électro-attracteurs comme le fluor ou un groupement méthoxy.

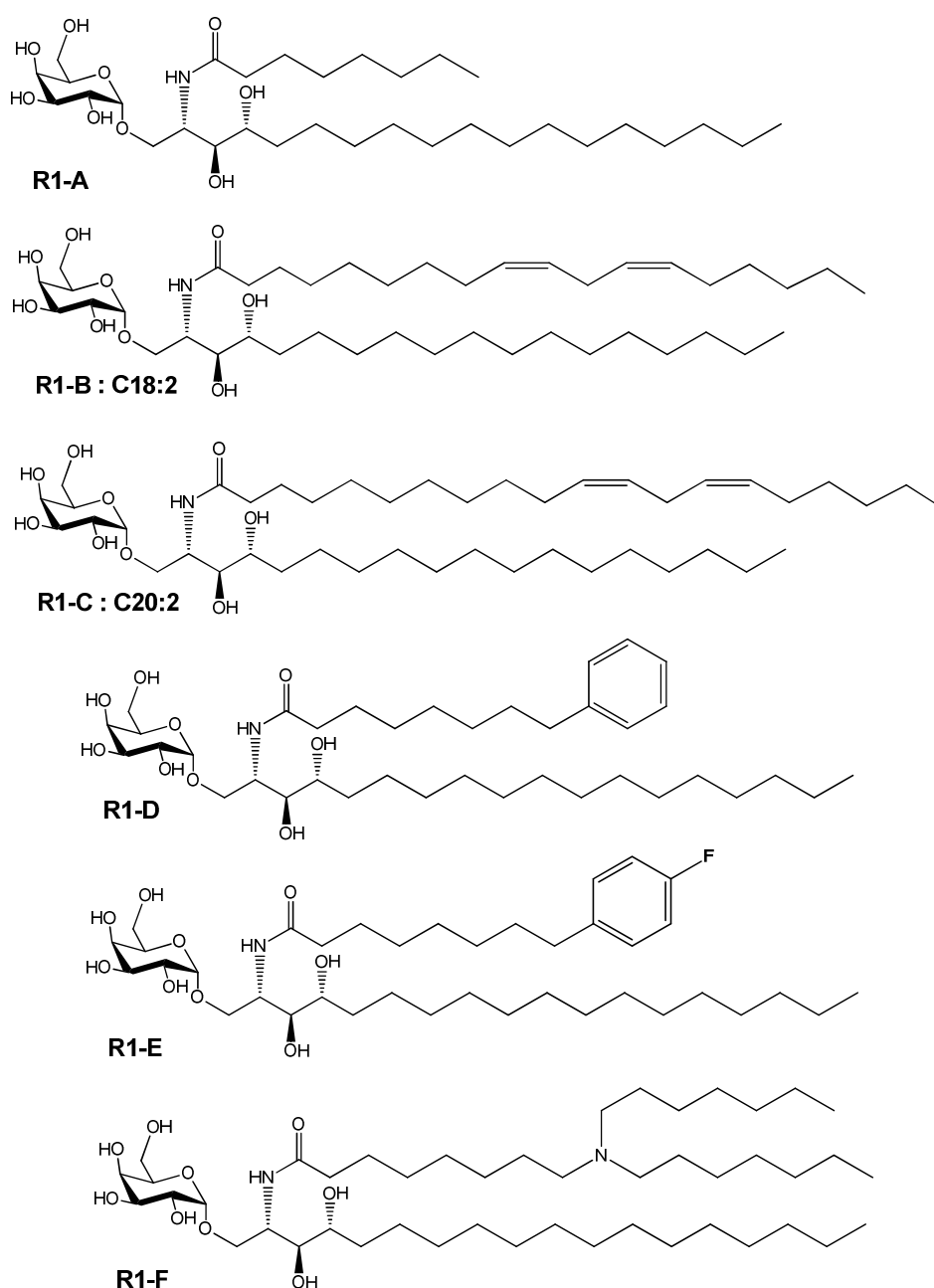


Figure I.21 : Modifications de la chaîne aliphatique R1

2) Modification de la chaîne aliphatique R2

Les modifications apportées sur la chaîne R2 ont généralement induit un profil pro-Th2. Le premier composé qui a changé significativement la réponse des cellules iNKTs vers un profil pro-Th2, est appelé OCH (figure I.22 : molécule OCH)^[117, 118]. Ce composé a montré son efficacité dans le cadre de maladies auto-immunes, comme l'EAE, avec l'induction d'un fort taux de production d'IL-4, et d'un taux d'IFN- γ nettement moins important. Il sert

actuellement encore de référence pour les analogues pro-Th2 nouvellement synthétisés (Velmougourane *et al.*^[111]). Un autre composé, synthétisé par Goff *et al.*,^[109] a induit un profil pro-Th2 aussi intéressant que la molécule OCH. Ils ont utilisé une chaîne R2 encore plus courte que OCH, avec seulement 2 carbones après les positions 3' et 4' OH (figure I.22 : molécule R2-A).

Quelques rares composés ont induit un profil pro-Th1, comme l'ont montré Chang *et al.*^[113] Ils ont ainsi raccourci la chaîne R2, mais ils y ont ajouté un groupement phényle en position terminale (figure I.22 : molécule R2-B). Ceci induit un taux de sécrétion d'IFN- γ beaucoup plus important que l'IL-4. L'explication de cette activité vient de la stabilité de la molécule dans le récepteur, grâce notamment au π -stacking se produisant entre le phényle de R2-B et des acides aminés aromatiques du récepteur. Cette réponse est néanmoins inférieure à celle induite par le KRN7000.

Le groupe de Luigi Panza a synthétisé des analogues avec une chaîne R2 aliphatique dont le CH₂ en position 6' est remplacé par un O.^[119] L'insertion de cette fonction éther ne procure aucun avantage, et ce quelque soit le groupement inséré en position terminal de R2. Une molécule s'en sort un peu mieux que les autres (figure I.22 ; molécule R2-C), avec une activation des iNKTs meilleure que les autres composés synthétisés (mesure du taux d'IL-2). Par contre, aucun test de sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4 n'a été effectué avec ces produits.

Pour conclure, le changement de la chaîne aliphatique R2 conduit de manière générale à des composés induisant un profil pro-Th2. Seul un type de composés induit un profil pro-Th1, avec la présence de groupement phényle en position terminale de cette chaîne R2. Comme on a pu le voir dans le paragraphe précédent, l'insertion du groupement phényle au bout de la chaîne R1, conduit à des composés également pro-Th1. L'association de deux chaînes fonctionnalisées par un phényle, comme l'ont montré Park *et al.*,^[115] n'induit pas de réponse pro-Th1 comme on pourrait l'espérer, mais empêche toute activation des cellules iNKTs.

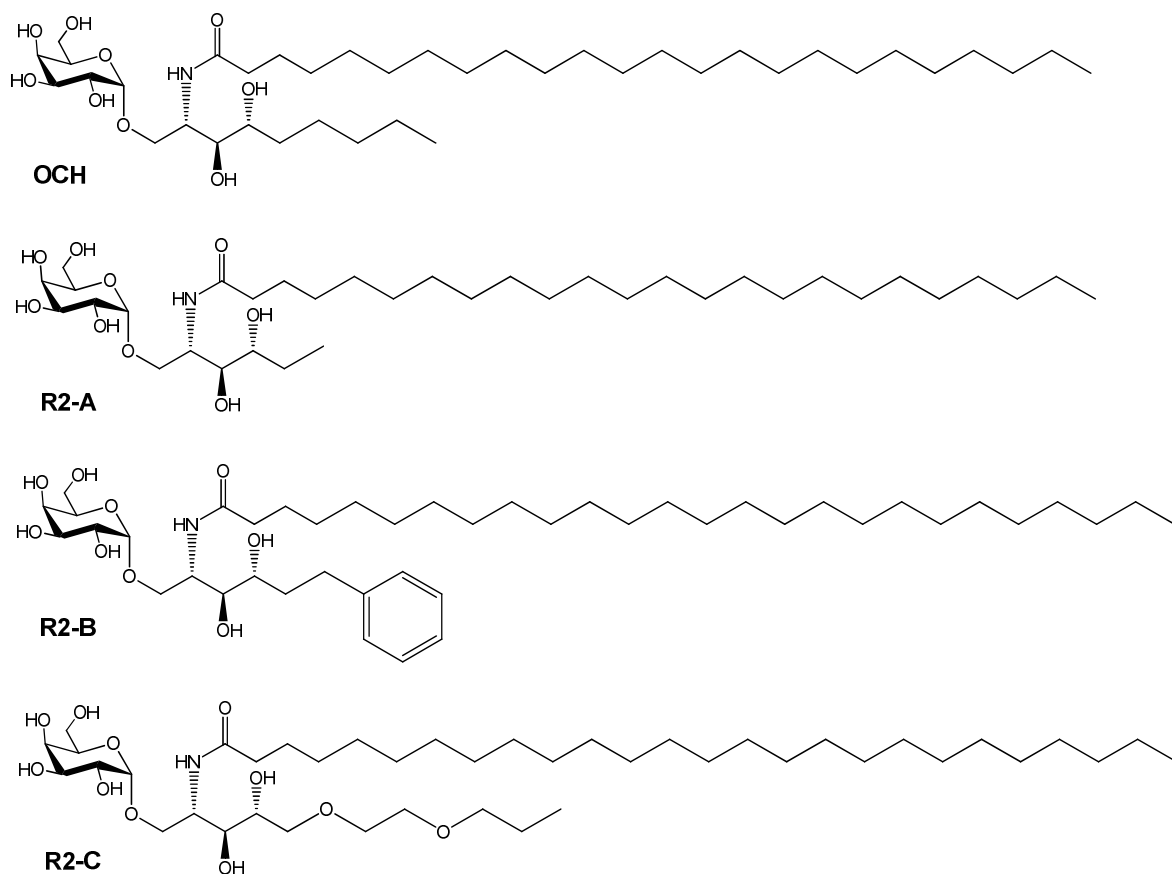


Figure I.22 : Modifications de la chaîne aliphatique R2

F) Structures cristallographiques du CD1d en présence de ligand analogue du KRN7000

La possibilité d'obtenir des structures cristallographiques du ligand dans son site de liaison a permis à différents auteurs de mieux comprendre le pourquoi de l'activité de leurs analogues du KRN7000. Ainsi Fujio *et al.* ont remarqué que le profil pro-Th1 de leurs composés ayant un phényle terminal sur la chaîne grasse R1 (R1-D, R1-E), est dû à du π - π stacking entre le phényle terminal et des acides aminés aromatiques composant le CD1d, stabilisant ainsi l'analogue dans le CD1d (figure I.23).^[112]

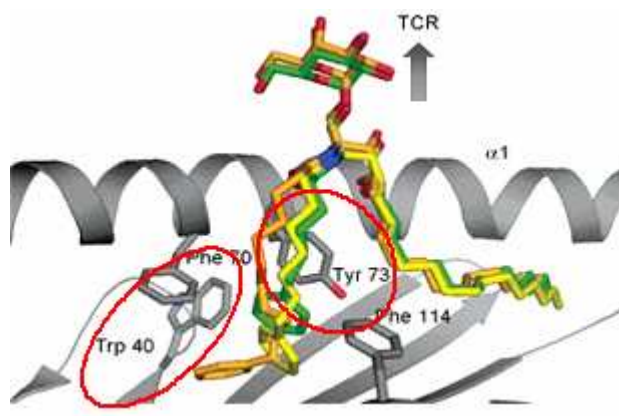


Figure I.23 : Structure cristallographique du CD1d et d'analogues ayant un groupement phényle en position terminale de la chaîne R1.^[90] Les groupements phényles des trois analogues représentés stabilisent les molécules dans le CD1d grâce à du π - π stacking avec le Trp40 ou la Tyr73.

Aspeslagh *et al.* ont testé la molécule N (qui possède un profil pro-Th1), synthétisée par Trappeniers *et al.*, pour également comprendre comment est insérée cette molécule dans le CD1d. Ils ont ainsi pu observer tout d'abord que la molécule N est stabilisée par une liaison hydrogène supplémentaire par rapport au KRN7000, avec la thréonine 159 (Thr159) et le carbonyle portant le groupement naphthalène (figure I.23).^[90]

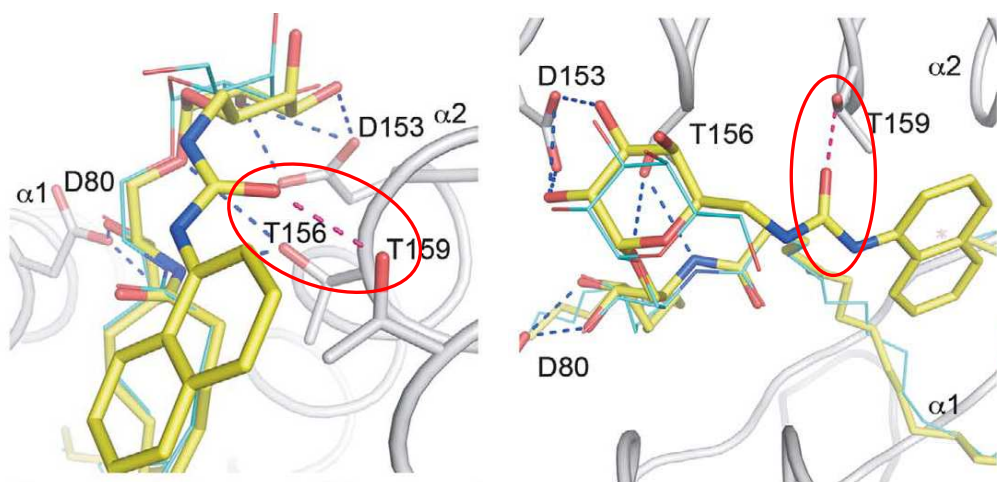


Figure I.23 : Structures cristallographiques du CD1d et de la molécule N.^[90] Sur ces deux images on peut voir l'hydroxyle de la Thr159 effectuant une liaison H avec le carbonyle en C6 de la molécule N (encerclé de rouge).

Ils ont aussi constaté que le naphthalène stabilise la molécule N grâce à du π - π stacking avec une phénylalanine, la Phe70 du CD1d (figure I.24).

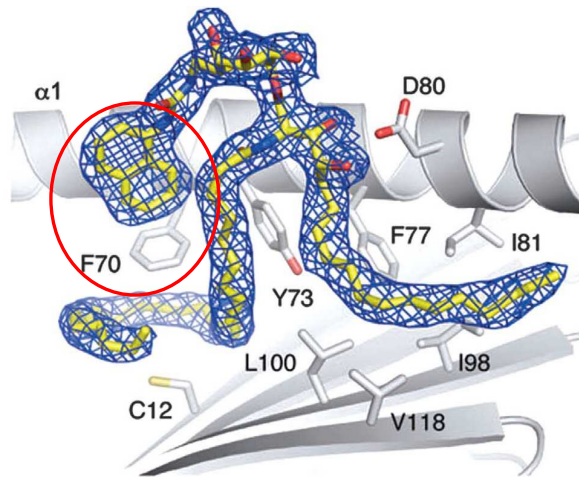


Figure I.24 : π - π stacking entre le CD1d et la molécule N.^[90] La molécule interagit avec la Phe70 présente à la surface de la poche hydrophobe A' du CD1d.

Une autre étude menée par Borg *et al.*^[120] a permis de montrer les liaisons qui se forment cette fois-ci entre le TCR des iNKTs, et la partie osidique du ligand. On constate que l'hydroxyle en 2 forme une liaison H avec l'acide aminé glycine 96 (Gly96), l'hydroxyle en 3 avec la sérine 30 (Ser30) et l'hydroxyle en 4 avec la phénylalanine 29 (Phe29). Le 3'OH de la partie céramide forme aussi une liaison H avec le TCR, *via* l'arginine 95 (Arg95). La position anomérique n'intervient pas dans cette reconnaissance, tout comme l'hydroxyle en position 6 du sucre qui n'interagit avec aucun acide aminé (figure I.26).

Ce modèle permet de comprendre la raison pour laquelle certains analogues, comme l' α -ManCer, ne sont pas reconnus. Dans le cas du mannose, ce sont les positions 2 et 4 OH qui sont dans des positions différentes de celle du galactose, empêchant une reconnaissance optimale par le TCR.

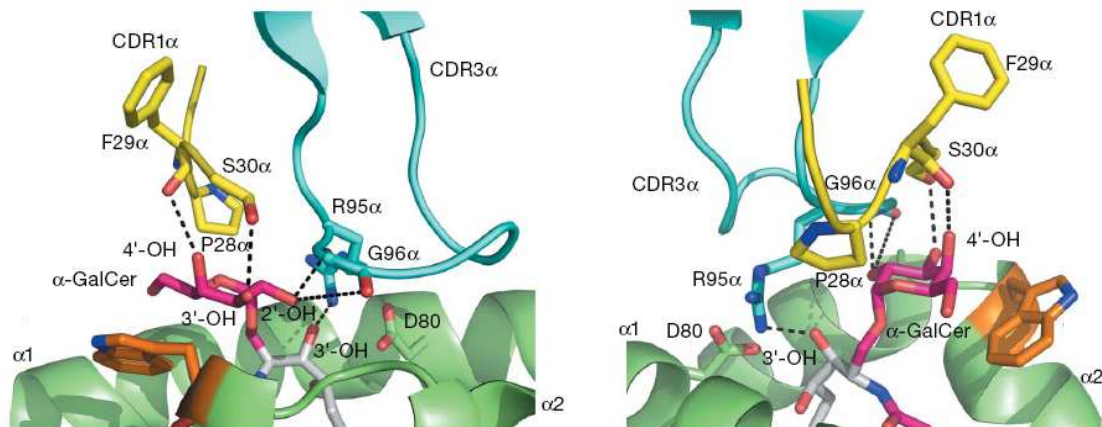


Figure I.26 : Structures cristallographiques du complexe CD1d / α -GalCer / TCR.^[87] Voici deux vues illustrant les liaisons H qui se forment entre la partie osidique du ligand et les acides aminés du TCR.

G) Balance cytokinique médiée par la reconnaissance du complexe CD1d / α -GalCer par les cellules iNKTs

La reconnaissance du complexe CD1d / α -GalCer par les iNKTs, va induire la sécrétion de cytokines. Comme on l'a déjà vu précédemment, ces cytokines sont divisées en deux classes, d'une part les cytokines pro-Th1 (IFN- γ , IL-2...) et les cytokines pro-Th2 (IL-4, IL-10...). Une autre cytokine intervient également, l'IL-12, sécrétée par les DCs lorsque celles-ci sont activées, et permet d'apporter un « boost » dans la sécrétion d'IFN- γ .

Les cytokines induisent une activité immunologique en s'auto-régulant. C'est ainsi que pour le KRN7000, l'IFN- γ et l'IL-12 inhibe le phénotype pro-Th2, alors que l'IL-4 désactive le phénotype pro-Th1.^[121] Mais apparemment la réponse biologique du KRN7000 est également dépendante du temps. En effet la production par les iNKTs de cytokines (IFN- γ et IL-4) est détectable après 2h suivant la stimulation, avant de passer à une réponse exclusivement pro-Th1 après 16h.^[29] Pour obtenir ce résultat, il faut que le complexe CD1d / ligand soit stable.

La nature des DCs prenant en charge le ligand, a aussi un impact sur la sécrétion cytokinique comme a pu le démontrer Schmieg *et al.*^[122] L'interleukine IL-12 est sécrétée par les DCs lorsque celles-ci sont liées à un ligand, permettant un « boost » d'IFN- γ . Si les cellules de Kupfer (cellule du foie) prennent en charge le ligand, il n'y a aucune sécrétion d'IL-12 après activation par les iNKTs.

La gestion de la balance cytokinique reste encore à ce jour assez mal connue, et même si quelques pistes existent pour expliquer cette balance, elles restent insuffisantes devant la complexité du phénomène. Néanmoins, la piste actuelle que certains auteurs comme Fujio ou Aspeslagh ont montré grâce aux structures cristallographiques, est que le profil pro-Th1 de leurs analogues est favorisé par la stabilité de leurs molécules dans le CD1d. Ceci laisse donc supposer que le profil de cytokines sécrétées est dépendant de la stabilité de l'analogue utilisé, avec une sécrétion d'IFN- γ pour un analogue stable, et une sécrétion d'IL-4 pour un analogue peu stable dans le CD1d.

VIII) Les vecteurs

A) Généralités

Dans le cadre de nos travaux sur l'optimisation de la réponse anti-tumorale du KRN7000, nous avons choisi d'insérer ce composé dans des vecteurs, afin d'améliorer la délivrance du KRN7000 aux DCs.

Ainsi les vecteurs sont utilisés comme transporteurs capables de véhiculer un principe actif dans un organisme, et procurent de nombreux avantages :

- 1) solubiliser les principes actifs hydrophobes
- 2) protéger la molécule active de la dégradation
- 3) réduire la toxicité systémique du principe actif, tout en conservant ou améliorant son efficacité thérapeutique
- 4) bénéficier d'un ciblage cellulaire (pour revue Liang *et al.*^[123] et Mufamadi *et al.*^[124]).

Plusieurs sortes de vecteurs existent, la différence se faisant notamment sur la nature des composés constitutifs.

Nous avons les vecteurs lipidiques, parmi lesquels nous trouvons les liposomes, constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides et de cholestérol, découverts en 1961 par Alec D. Bangham et possédant un cœur hydrophile. Parmi ces vecteurs nous avons aussi les micelles, qui sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles, formant des structures de type coeur-coquille en milieu aqueux. C'est-à-dire que les molécules amphiphiles s'auto-assemblent en monocouche pour regrouper leurs parties hydrophobes, et exposer à la surface uniquement les domaines hydrophiles. Ceci signifie qu'à l'inverse des liposomes, les micelles ont un cœur lipophile.^[125] Plus récemment, les nanoparticules lipidiques constituées de triglycérides ou de cires ont été décrites. Elles sont divisées en deux groupes que l'on appelle SLN (« Solid Lipid Nanoparticles »)^[126] et LNC (« Lipid NanoCapsules »)^[127].

Une autre famille de vecteurs est constituée de polymères. On y retrouve des micelles de polyester ou de poly(L-amino acide),^[125] mais aussi les niosomes, composés de surfactants non ioniques comme des esters de sucrose ou du polyoxyéthylène alkyl éther.^[128] Les nanoparticules polymères, découverts par Couvreur *et al.* en 1979, sont constituées de polycyanoacrylate.^[129] Depuis de multiples polymères ont été utilisés parmi lesquels on trouve l'acide poly lactique (PLA), l'acide poly glycolique (PGA), et leur copolymère l'acide

poly lactique-coglycolide (PLGA), qui présentent l'avantage d'être biodégradables. On peut citer aussi parmi ces nanoparticules polymères, les nanogels constitués de polymères hydrophiles,^[130] et les dendrimères qui sont des complexes polymériques construits par ajout successif de monomères.^[131]

On peut aussi citer comme vecteurs les nanoparticules inorganiques, comme les nanoparticules magnétiques (composés d'oxydes de fer comme la maghémite (Fe_2O_3) ou la magnétite (Fe_3O_4)) ou les nanoparticules d'or.^[132, 133]

Enfin pour finir ce descriptif, nous pouvons citer les nanotubes de carbone, découverts par Iijima en 1992.^[134] Les domaines d'applications utilisant cette technologie varient de l'industrie aéronautique au domaine biomédical.^[135]

Dans la suite nous nous intéresserons plus particulièrement aux liposomes, qui sont les vecteurs que nous allons utiliser dans nos travaux pour optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale du KRN7000, en l'insérant directement dans la bicouche du liposome. Ceci afin d'améliorer la délivrance du KRN7000 aux DCs pour notamment éviter le phénomène d'anergie, comme ont pu le laisser sous-entendre Fujii *et al.*^[61]

B) Le liposome

1) Structure, composition et insertion

Les liposomes ont été produits pour la première fois en Angleterre par Alec D. Bangham en 1961, qui étudiait les phospholipides et la coagulation du sang. Il a ainsi découvert que les phospholipides mis en présence d'eau formaient des sphères.

Les liposomes sont donc des vésicules sphériques, composées d'une membrane comportant une ou plusieurs bicouches de phospholipides, renfermant une cavité centrale aqueuse (figure I.27).

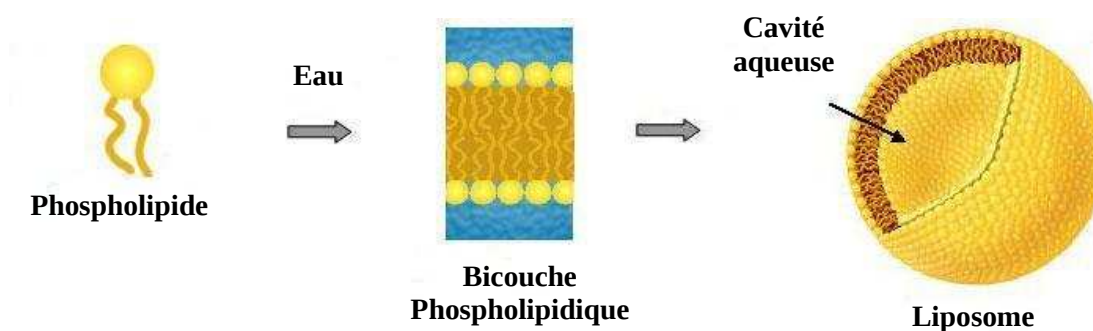


Figure I.27 : Structure d'un liposome (d'après www.nanonigeneau.com).

Les bicouches sont composées de phospholipides naturels ou synthétiques, organisés de manière similaire à ceux présents dans les membranes des cellules. La proportion de cholestérol insérée dans les bicouches permet de jouer sur la stabilité des liposomes. La nature des phospholipides employés va également jouer sur la rigidité des membranes et sur leur perméabilité.

La charge et la taille des vésicules varient en fonction de la méthode de préparation et des phospholipides utilisés. Il existe donc plusieurs types de liposomes^[136], dont certains sont décrits dans le tableau I.1 ci-dessous :

Tableau I.1 : Classification des liposomes suivant la taille.^[136]

Désignation	Nom complet	Taille
SUV	Small Unilamellar Vesicle	20-100 nm
LUV	Large Unilamellar Vesicle	> 100 nm
OLV	Oligolamellar Vesicle	0,1-1 μm
MLV	Multilamellar Vesicle	> 0,5 μm
GUV	Giant Unilamellar Vesicle	> 1 μm

Les liposomes sont utilisés pour vectoriser une large gamme de molécules (figure I.28). Il existe pour cela trois modes d'association :

- encapsulation de la phase aqueuse contenant un composé hydrophile
- insertion d'un composé hydrophobe dans la bicouche
- couplage d'un composé en surface du liposome

Dans le cas de l'ADN, comme montré sur la figure I.28, l'utilisation de phospholipides cationiques permet d'améliorer sa vectorisation, car l'ADN possède une charge globale négative.

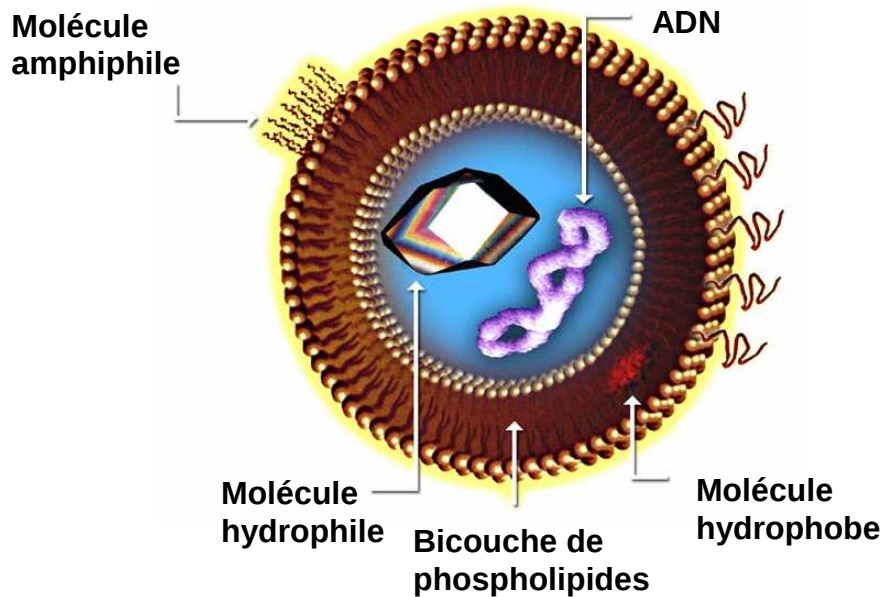


Figure I.28 : Exemple de vectorisation de molécules de natures différentes (d'après le site : <http://www.pratt.duke.edu/node/2570>).

Par le fait qu'il soit possible d'insérer dans la bicouche du liposome différentes molécules, le liposome est un vecteur intéressant. En effet dans le cas par exemple de la recherche d'une amélioration de la délivrance d'un principe actif, il est ainsi possible d'insérer dans la bicouche du liposome des composés permettant de faciliter ou de diriger spécifiquement le vecteur vers la cellule cible du principe actif.

2) Le liposome *in vivo*

Le liposome, on l'a vu, est capable de prendre en charge différents composés. Mais l'un des problèmes majeurs de ce vecteur, réside dans le fait qu'une fois dans l'organisme il est dégradé assez rapidement (temps de demi-vie d'environ 1 h).^[136] En effet une fois dans la circulation systémique, il va être en contact avec le système immunitaire, opsonisé et phagocyté.

C'est pourquoi on le retrouve essentiellement dans les organes primaires que sont le foie, la rate et les poumons. Tout ceci limite la capacité du liposome à atteindre sa cible, notamment dans le cas du traitement d'autres organes.

Pour palier à ce problème, deux solutions ont été développées à la fin des années 80, avec d'une part l'insertion d'un ganglioside, appelé GM1^[137] (monosialoganglioside), et de l'autre, l'insertion d'un phospholipide fonctionnalisé par un groupement polyéthylèneglycol

(PEG)^[138]. Ces procédés permettent d'obtenir des liposomes dits furtifs (« stealth liposomes »). Ainsi, au bout de 24h on observe pour les liposomes non furtifs moins de 1% de la dose administrée dans le sang, alors que pour les liposomes furtifs on observe encore environ 40% de la dose administrée dans le sang. Ces deux composés ont donc permis d'augmenter le temps de demi-vie des liposomes dans l'organisme.

3) Applications thérapeutiques à base de liposomes

Il existe à l'heure actuelle plusieurs spécialités qui utilisent le liposome comme vecteur de principes actifs^[139]. On peut citer l'ATRAGEN[®] d'Aronex Pharmaceuticals (principe actif : tretinoïne, qui est la forme acide de la vitamine A), utilisé dans le cadre du cancer de la prostate et de leucémie. Le Doxil[®] de Janssen (principe actif : doxorubicine), utilisé contre le cancers des ovaires, ou encore la L-Annamycin de Callisto Pharmaceuticals contre le cancer du sein. D'autres formulations existent aussi pour traiter des infections bactériennes ou fongiques (ex : AmBisome[®] de Gilead Sciences (principe actif : Amphotéricine B) ou Nyotran[®] d'Aromex Pharmaceuticals (principe actif : nystatine)). On peut encore citer le Stimuvax[®] (connu également sous le nom de BLP25) développé par Merck. Ce vaccin consiste en un peptide de 25 acides aminés, qui correspond à une partie répétée de la protéine MUC1, encapsulé dans un liposome. Cette protéine est exprimée sur de nombreuses cellules cancéreuses, comme dans le cas des cancers du poumon, du sein, de la prostate ou le cancer du colon. Ce vaccin est actuellement en essai clinique de phase III (source : www.merckgroup.com).

IX) Conclusion

En conclusion, nous avons vu que les dérivés d' α -GalCer sont une famille de molécules très étudiée à l'heure actuelle. Très rapidement leurs propriétés thérapeutiques se sont montrées très intéressantes,^[2] avec notamment des propriétés anti-tumorales, confirmées depuis sur des modèles murins à de nombreuses reprises.^[87-89, 113]

De nombreux groupes cherchent encore aujourd'hui à synthétiser des molécules ayant une spécificité cytokinique, soit pro-Th1, soit pro-Th2. Mon travail de thèse s'inscrit dans cette démarche. En collaboration avec l'équipe du Dr. François Trottein (Institut Pasteur de Lille), nous avons cherché à obtenir des composés ayant un profil pro-Th1, afin de favoriser la

réponse anti-tumorale. Cette famille d'analogues s'appelle KRN-Phe et pour les synthétiser nous avons choisi d'utiliser deux modèles pro-Th1 présents dans la littérature pour maximiser la réponse pro-Th1 de nos analogues. Nous avons ainsi utilisé le modèle de Fujio *et al.* avec un groupement phényle présent en position terminale de la chaîne grasse R1, et également le modèle de Trappeniers *et al.* avec le couplage d'un groupement aromatique en position C6 du sucre.^[89, 112] A noter que nous avons également greffé en position C6 d'autres groupes hydrophobe comme une tétraline ou un tert-butyl, mais aussi des groupes hydrophiles comme un NH₂ ou un PEG₂₀₀₀, ce dernier permettant d'augmenter la solubilité de la molécule dans une solution aqueuse (figure I.29).

KRN-Phe ; R= NH₂, Naphtalène, Tétraline, PEG₂₀₀₀, Tert-butyl

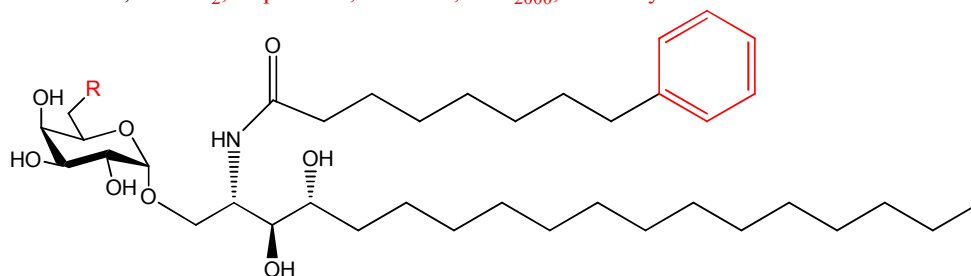
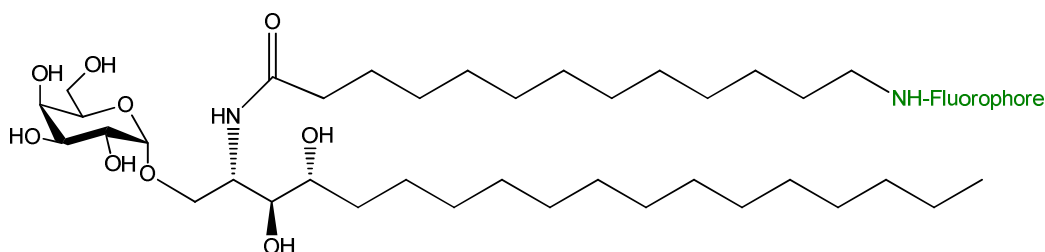


Figure II.29 : Analogues KRN-Phe synthétisés.

Dans un deuxième temps, nous avons synthétisé des analogues fluorescents appelé KRN-fluorophore, possédant un fluorophore en position terminale de la chaîne grasse R1 (KRN-FITC ; KRN-Cy5). Le but de ces analogues est de pouvoir suivre les composés lors des tests biologiques, afin de pouvoir identifier quel(s) sous-type(s) de DCs présente(nt) le KRN7000 aux cellules iNKTs. Le fluorophore est couplé sur la chaîne grasse R1 suivant le modèle de Kamijuku *et al.* (figure I.30).^[140]

KRN fluorescent ; Fluorophore = Cy5-COOH, FITC



La synthèse et les résultats biologiques des différents analogues obtenus sont présentés dans le chapitre II.

Dans le cadre de la vectorisation du KRN7000, nous avons aussi vu dans ce chapitre la flexibilité qu'offre les vecteurs en terme de transport de molécules ou de modifications de propriétés de surface. Notre objectif étant d'optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale du KRN7000, nous allons exploiter les possibilités de transport des liposomes pour le vectoriser, et celles de modification de surface pour optimiser la réponse anti-tumorale. Nous agirons dans un premier temps notamment sur leur taille (utilisation de liposomes REV) et sur leur temps de demi-vie (utilisation de PEG₂₀₀₀ à la surface du vecteur) pour augmenter la biodisponibilité du KRN7000. Dans un second temps, nous agirons sur le ciblage des DCs afin d'améliorer la délivrance du KRN7000 à ces cellules. Ceci permettra également d'observer l'impact du ciblage des DCs sur l'anergie, car l'hypothèse figurant dans la littérature stipule que lorsque le ligand est pris en charge quasi exclusivement par les DCs,^[61] l'anergie des cellules iNKTs est levée. Pour cibler les DCs, nous utiliserons des composés mannosylés, ciblant le récepteur mannose, ou des fragments d'anticorps dirigés contre le récepteur CD11c. Enfin dans un troisième temps, nous souhaitons améliorer la réponse anti-tumorale par la stimulation de la réponse immunitaire adaptative, avec notamment l'utilisation de ligands des TLR 2/1 et 2/6 (récepteurs impliqués dans la maturation des DCs), mais également de peptides d'intérêts dirigés contre un modèle tumorale.

Le chapitre III illustrera donc la vectorisation du KRN7000, ainsi que les modifications apportées à nos vecteurs (liposomes). Le chapitre IV ensuite illustrera les résultats biologiques obtenus avec nos constructions. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec les équipes du Dr. François Trottein de l'Institut Pasteur de Lille et du Pr. Sylvie Fournel de l'IBMC de Strasbourg.

CHAPITRE II :
Synthèse d'analogues d' α -GalCer – Résultats et
discussion

I) Synthèse de nouveaux analogues de l' α -GalCer

A) Généralités

Pour stimuler le système immunitaire innée de manière contrôlée (pro-Th1 ou pro-Th2), nous avons été amenés à synthétiser de nouveaux analogues de l' α -GalCer. Nous nous sommes concentrés sur la synthèse de dérivés α -(O)-GalCer, ayant une chaîne grasse et une position C6 du sucre fonctionnalisées en vue de provoquer majoritairement une réponse pro-Th1 (anti-tumorale). Pour cela, notre stratégie se base sur l'insertion d'un groupement aromatique sur l'une des chaînes grasses suivant le modèle présenté par Fujio *et al.*,^[112] mais également sur la fonctionnalisation de la position C6 par des groupements aromatiques suivant la stratégie de Trappeniers *et al.*^[89] Le but étant de cumuler les effets observés par ces deux groupes pour maximiser la réponse pro-Th1. On obtient ainsi les analogues appelés KRN-Phe.

Un deuxième groupe d'analogues du KRN7000 est synthétisé, appelé KRN-fluorophore, servant à identifier quel(s) sous-type(s) de DC présente(nt) le KRN7000 aux cellules iNKTs. Les voies de synthèses conduisant au KRN7000 et à ses analogues sont nombreuses dans la littérature. Nous allons en présenter quelques unes dans le paragraphe suivant, montrant ainsi les différentes voies utilisées pour la synthèse de la partie osidique et de la partie céramide. Nous verrons également les méthodes utilisées pour associer ces deux entités synthétisées.

B) Stratégie de synthèse des analogues du KRN7000 développée dans la littérature

1) Stratégie générale

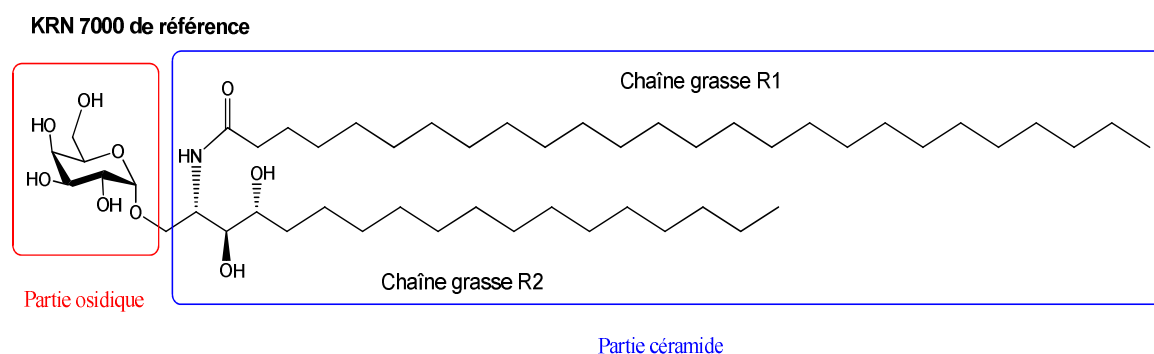


Figure II.1 : Présentation de l' α -GalCer de référence, le KRN7000. Entourée de rouge la partie osidique, entourée de bleu la partie céramide.

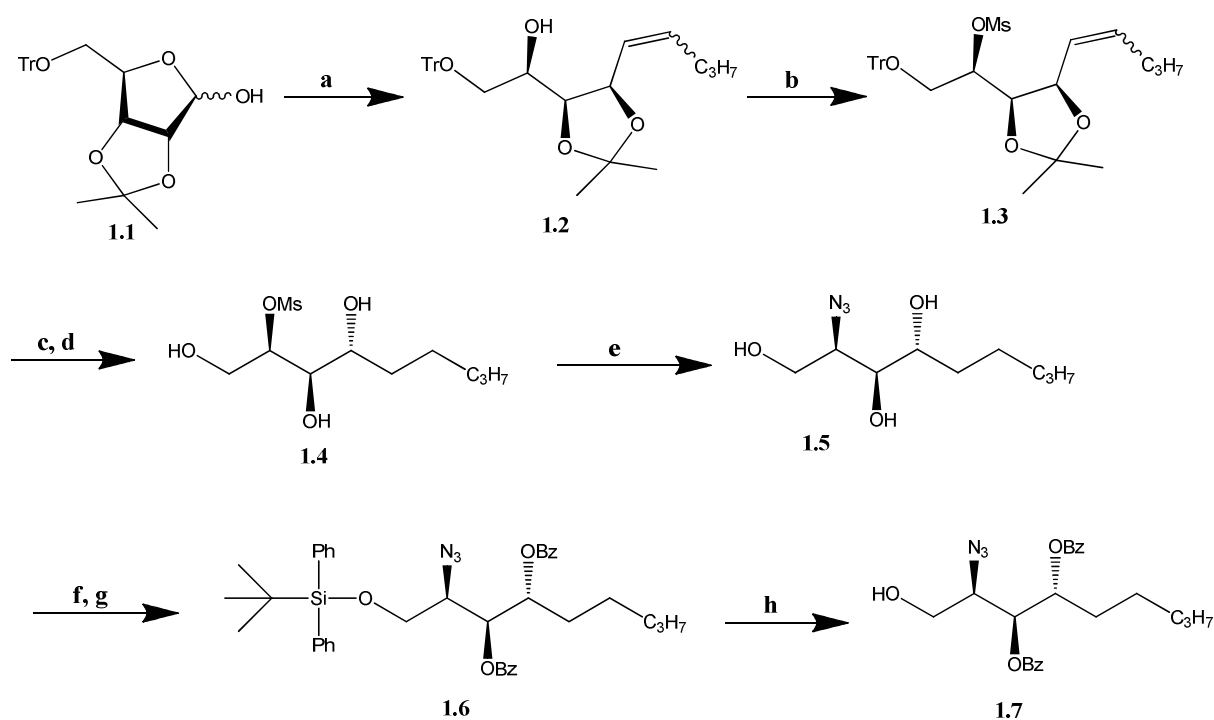
La synthèse débute par l'obtention de deux parties, comme celles présentées sur la molécule de référence, le KRN7000 (figure II.1). D'un côté, la partie osidique constituée du galactose (entourée de rouge sur la figure II.1), de l'autre la partie phytosphingosine, constituée des chaînes grasses R1 et R2 (entourée de bleu sur la figure II.1). L'étape clé de la synthèse est la réunion des deux parties *via* un couplage α sélectif.

Nous allons ainsi voir les méthodes existantes et utilisées dans la littérature pour synthétiser ces deux parties, avec tout d'abord la synthèse de la partie céramide, puis celle de la partie osidique, et nous verrons ensuite les méthodes utilisées pour réunir ces deux entités afin de conserver une conformation α nécessaire à la bonne reconnaissance du ligand par le CD1d et le TCR des iNKTs.

2) Synthèse de la partie phytosphingosine

a) Synthèse de la [2S, 3S, 4R] phytosphingosine *via* des dérivés osidiques

De nombreux analogues présentés dans la littérature utilisent les dérivés osidiques pour obtenir leur partie céramide. Nous allons présenter ici les méthodes utilisées récemment par Veerapen *et al.*,^[141] utilisant du D-lyxose comme précurseur, et celle de Cheng *et al.*,^[142] utilisant du D-galactose.

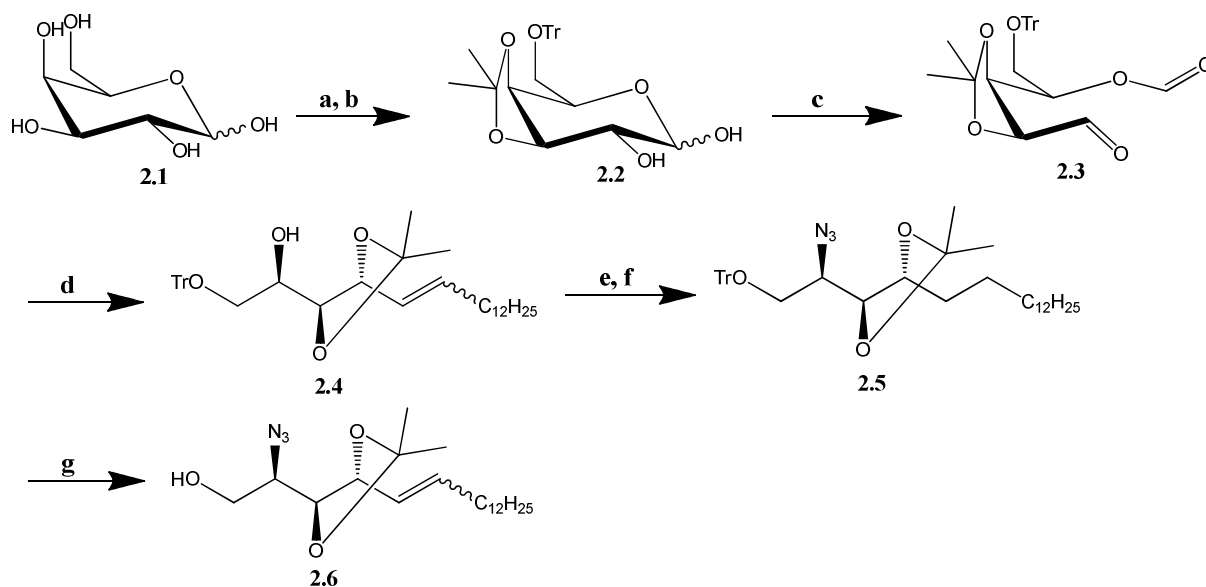


(a) $n\text{-BuLi}$, THF, sel de phosphonium ($\text{C}_4\text{H}_9\text{PPh}_3^+\text{I}^-$), 82% ; (b) MsCl , pyridine, CH_2Cl_2 , quant ; (c) HCl , $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; (d) H_2 , Pd-BaSO_4 , THF, 77% ; (e) NaN_3 , DMF, 63% ; (f) TBDPSCl , pyridine, quant ; (g) BzCl , pyridine, 86% ; (h) TBAF , THF, 80%.

Schéma II.1 : Synthèse du dérivé [2*S*, 3*S*, 4*R*] phytosphingosine à partir du *D*-lyxose. (d'après Veerapen et al.^[141])

La méthode utilisant le *D*-lyxose est présentée sur le schéma II.1. L'étape importante de cette synthèse est la réunion de la chaîne grasse avec le lyxose 1.1 commerciale, qui se fait *via* une réaction de Wittig, pour donner le produit 1.2. La suite n'est qu'une succession de protection-déprotection des hydroxyles, jusqu'à obtenir le produit 1.7 désiré.

L'avantage de cette synthèse réside dans le contrôle de la stéréochimie des centres chiraux imposé par le sucre, évitant ainsi la purification de diastéréoisomères. Le désavantage de cette synthèse est sa longueur, qui comporte 8 étapes pour obtenir le produit 1.7.



(a) TrCl, pyridine ; (b) acétone, CuSO₄, 85% (deux étapes) ; (c) NaIO₄, H₂O, quant. ; (d) BuLi, BrPh₃PC₁₃H₂₇, THF, 15 min, puis **3**, 78% ; (e) H₂, Pd/C, THF, quant. ; (f) Tf₂O, CH₂Cl₂, pyridine, puis NaN₃, DMF, 81% ; (g) TFA, TES, Me₂C(OMe)₂, CH₂Cl₂, 63%.

Schéma II.2 : Synthèse du dérivé [2S, 3S, 4R] phytosphingosine à partir du D-galactose (d'après Cheng et al.^[142])

La synthèse du dérivé [2S, 3S, 4R] phytosphingosine à partir du D-galactose est présentée sur le schéma II.2. Comme précédemment, l'étape clé de cette synthèse est l'ajout de la chaîne grasse *via* une réaction de Wittig pour conduire au composé 2.3. Cette synthèse présente les mêmes avantages que la synthèse précédente, à savoir que la stéréochimie des hydroxyles est imposée par le sucre. Ce qui permet d'éviter de purifier des diastéréoisomères. Mais là aussi le désavantage est la longueur de la synthèse, qui comporte 7 étapes pour arriver au produit 2.6.

b) Synthèse de la phytosphingosine *via* un dérivé sérine

Cette méthode décrite par Ndakala *et al.*^[143] met en jeu une N-Boc-Sérine comme précurseur. Mais pour former la phytosphingosine di-hydroxylé finale, il faut plus de 10 étapes de synthèse, avec une stéréochimie qui n'est pas parfaite. Sur le schéma II.3 sont résumées les étapes nécessaires pour l'obtention du D-xylo-phytosphingosine.

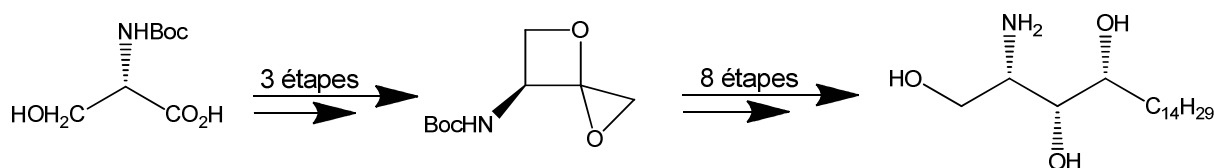
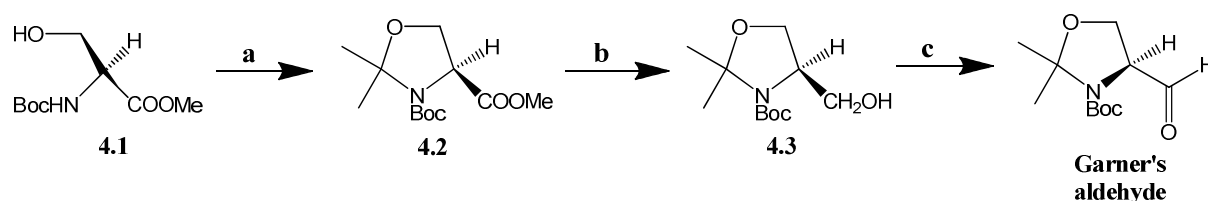


Schéma II.3 : Synthèse de la phytosphingosine *via* la N-Boc-Sérine.

c) Synthèse du dérivé [2S, 3S, 4R] phytosphingosine via l'aldéhyde de Garner

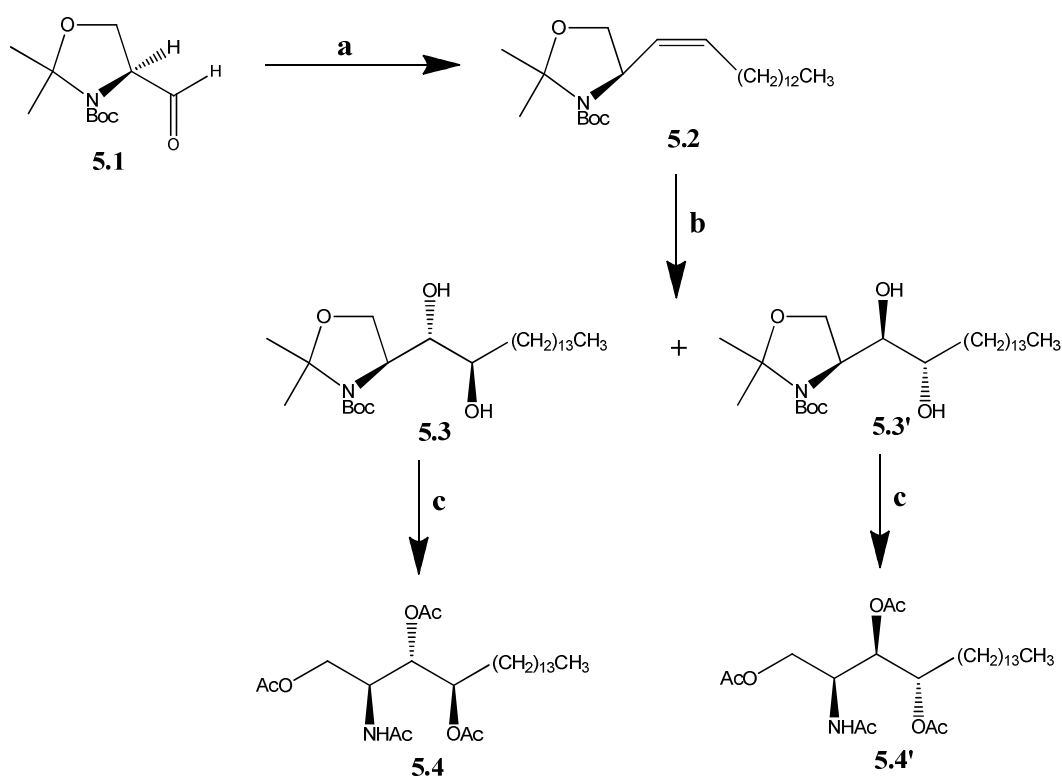
La deuxième voie de synthèse la plus fréquente pour l'obtention de la [2S, 3S, 4R] phytosphingosine, est celle utilisant comme précurseur l'aldéhyde de Garner.^[144] Sa préparation est présentée sur le schéma II.4.



(a) 2,2-dimethoxypropane, acétone, $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, 91% ; (b) LiAlH_4 , THF, 91% ; (c) 1) Chlorure d'oxalyle, DMSO, 2) TEA, 96%.

Schéma II.4 : Synthèse de l'aldéhyde de Garner.

La phytosphingosine est donc obtenue à partir de l'aldéhyde de Garner préalablement préparé, comme ont pu le décrire Azuma *et al.*^[145] La réaction décrite sur le schéma II.5 indique que la chaîne grasse R2 est liée à l'aldéhyde de Garner *via* une réaction de Wittig pour conduire au produit 5.2, qui est le composé majoritaire *cis* (Z). Le rapport énantiomérique (Z/E) est de 9/1 pour la forme Z.



(a) $C_{15}H_{31}PPh_3$ Br, LHMDS, 66% ; (b) N-Methylmorpholine N-oxide hydrate, OsO_4 , 55% pour 5.3, 19% pour 5.3' ; (c) CF_3COOH , puis Ac_2O , DMAP, 73% pour 5.4, 52% pour 5.4'.

Schéma II.5 : Synthèse de la phytosphingosine (2S, 3S, 4R) via l'aldéhyde de Garner (d'après Azuma et al.^[145])

Pour générer le diol 5.3 avec la bonne conformation (3S, 4R), le tetroxide d'osmium (OsO_4) est utilisé en quantité catalytique et en présence d'un cooxydant, la N-méthylmorpholine N-oxide hydrate. Ce composé est utilisé pour régénérer le OsO_4 dans le milieu. Le produit 5.3 désiré (2S, 3S, 4R) est obtenu avec un rendement de 55%, ainsi que le diastéréoisomère 5.3' non désiré (2S, 3R, 4S) avec un rendement plus modeste de 19%. L'étape suivante consiste en l'ouverture du cycle oxazolydine et de l'hydrolyse du groupement protecteur Boc, puis de la protection des différentes fonctions alcools par de l'anhydride acétique pour donner la tétra-acétyl-D-ribo-phytosphingosine 5.4.

Si l'on compte la synthèse de l'aldéhyde de Garner, cette synthèse comporte 6 étapes, ce qui est plus court que ce qui a été montré jusqu'à présent. Mais l'inconvénient ici est que l'on a la présence de purifications complexes pour séparer les différents énantiomères et diastéréoisomères obtenus.

d) Conclusion

Les synthèses mettant en jeu des oses sont intéressantes du fait de la stéréochimie des hydroxyles 3 et 4 qui est imposée initialement par le sucre utilisé. Mais la multiplication des étapes de protection-déprotection des hydroxyles (pour le lyxose) et le nombre d'étapes des synthèses (lyxose et galactose) font que dans ce travail de thèse, nous avons préféré reprendre la synthèse mettant en jeu l'aldéhyde de Garner. Elle possède l'avantage d'être courte et la présence du cycle oxazolydine permet de protéger préalablement les hydroxyles en position 3'OH et 4'OH, par des groupements protecteurs comme le benzyle ou le benzoyle, sans avoir à s'occuper de l'amine en 2 ou de l'alcool primaire.

3) Couplage de la partie osidique

Différentes méthodes d'obtention d' α -(O)-GalCer sont décrites dans la littérature. Les plus courantes mettent en jeu des thio-galactosides, des galactoses trichloroacétimide, des galactoses fluoré, iodé ou bromé. Ces dérivés sont décrits dans les paragraphes suivants.

a) Utilisation des dérivés thio-galactosides

Pour coupler des sucres thiolés, divers agents de couplage sont utilisés. Ce sont essentiellement des triflates qui sont utilisés comme le Dimethyl(MethylThio)Sulfonium Triflate (DMTST), le benzenesulfonyl triflate (PhSOTf) ou le para-toluenesulfonyl (p -TolSOTf). Récemment, Veerapen *et al.* ont utilisé un autre moyen pour coupler leur thiogalactoside, à savoir du para-nitrobenzenesulfonyl (p -NO₂PhSOCl) avec du triflate d'argent (AgOTf), méthode développée par Crich *et al.*^[146, 147] Cette réaction illustrée sur le schéma II.6, donne un bon rendement de 75%, avec une sélectivité de 100% pour la forme α .

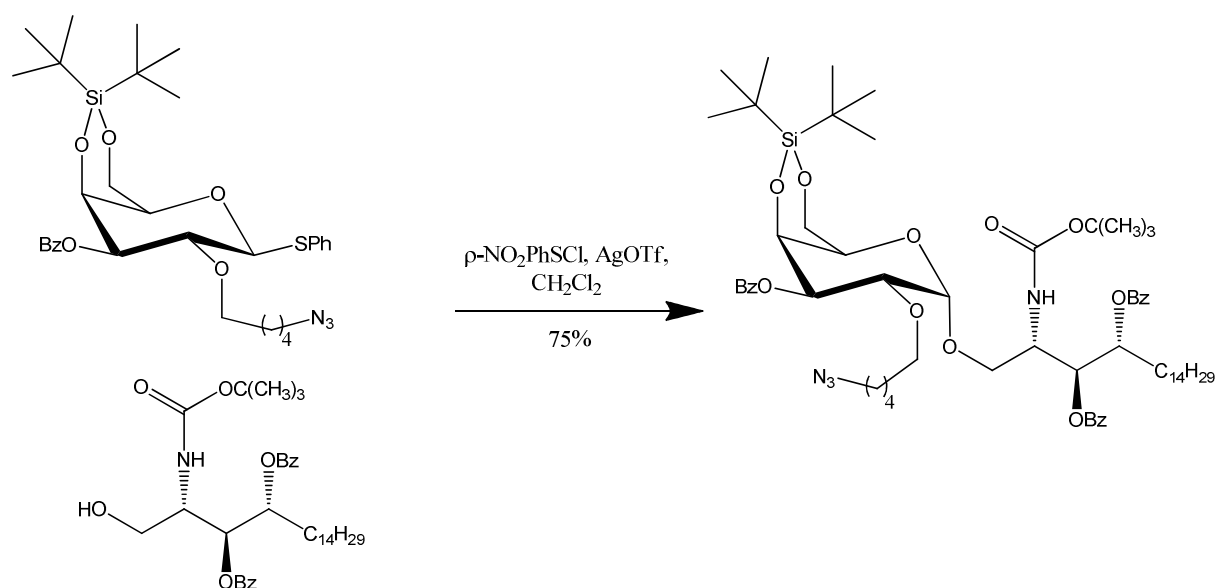


Schéma II.6 : Couplage d'un thio-galactoside sur une céramide (d'après Veerapen et al.^[146])

b) Couplage de dérivés galactose-trichloroacétimides

Ce type de dérivé est très présent dans la littérature. Les groupements protecteurs présents sur le sucre auraient une influence sur la stéréochimie du couplage. On peut ainsi voir que Figueroa-Perez *et al.* ont obtenu sélectivement 100% de forme α avec un sucre protégé en 2 et 3 par des benzyles, et en 4 et 6 par un benzylidène (Schéma II.7 A).^[148] Plettenburg *et al.* ont obtenu un mélange α/β (rapport 2,9/1) en utilisant un sucre tétrabenzylé en 2, 3, 4 et 6.^[149] Plus récemment, Shiozaki *et al.* ont synthétisé plusieurs analogues du KRN7000, en utilisant divers sucres trichloroacétimide (Schéma II.7 B et C). Seul le sucre possédant un groupement di-*tert*-butyl-silyl en position 4 et 6 permet d'avoir une stéréosélectivité 100% α (Schéma II.7 C), contredisant au passage Figueroa-Perez *et al.*.^[107] Ces résultats sont présentés sur le schéma II.7.

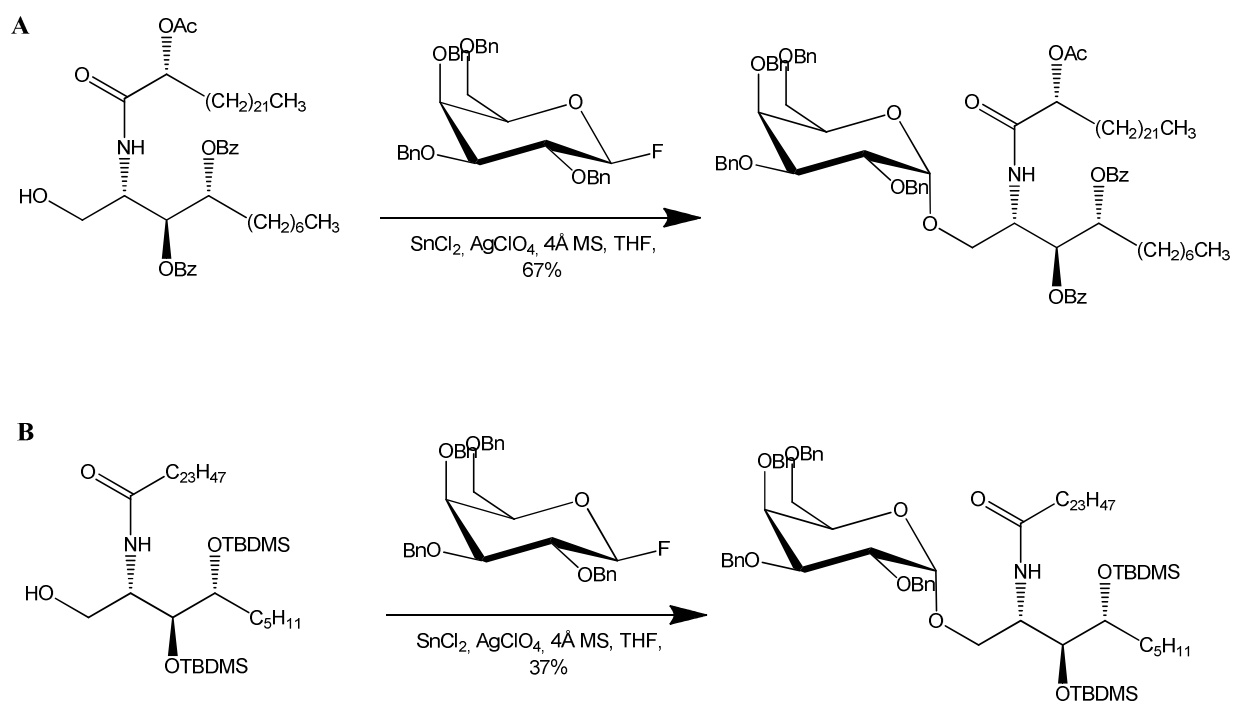
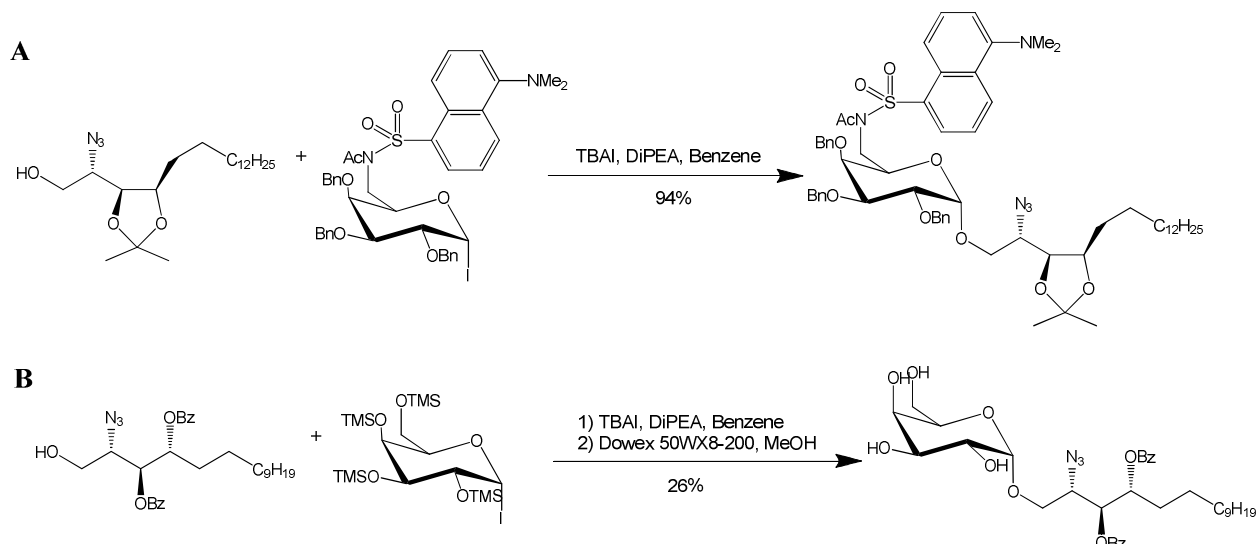


Schéma II.8 : Couplage glycosidique avec utilisation de dérivés fluorés.

d) Utilisation de dérivés iodés

Hadd et Gervay ont été les premiers à montrer que l'utilisation de dérivés iodés permettaient d'obtenir un couplage α stéréosélectif.^[152] Ce procédé a été utilisé récemment dans la littérature sur deux synthèses pour obtenir des analogues du KRN7000. Les rendements obtenus sont ici aussi très variables, du fait de la grande réactivité des dérivés glycosidiques iodés. On peut ainsi voir sur le schéma II.9, que Cheng *et al.*^[142] ont obtenu un rendement de 94% pour ce couplage (Schéma II.9 A), alors que Veerapen *et al.*^[141] ont obtenu des rendements compris entre 46 % et 26% pour leurs composés (Schéma II.9 B).



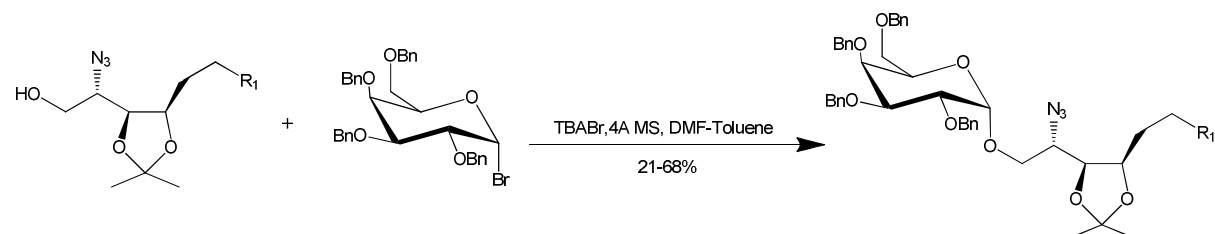
TBAI : Tetra-Butyl-Ammonium Iodide ; DiPEA : DiisoprpylEthylAmine ; TMS : TriMethylSilane

Schéma II.9 : Couplage glycosidique avec utilisation de dérivés iodés.

e) Utilisation de dérivés bromés

Cette méthode a été mise au point par Lemieux *et al.*^[153] Ils ont mis au point une expérimentation permettant d'obtenir un couplage α sélectif entre un glycoside tetra-benzylé et bromé et la céramide en utilisant du TBABr (Tetra-Butyl-Ammonium Bromide) dans un solvant aprotique comme le CH_2Cl_2 . L'inconvénient de la méthode est identique aux dérivés iodés, à savoir la stabilité du résidu bromé qui doit être utilisé rapidement.

Toba *et al.* ont utilisé ce procédé pour synthétiser des alpha-galactosylcéramide.^[154] Ils ont effectivement eu un couplage sélectif comme l'illustre le schéma II.10, mais avec des rendement variables en fonction de la céramide utilisée.



$\text{R1} = -\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$; $-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $-\text{C}_5\text{H}_8$; $-\text{C}_6\text{H}_5$

Schéma II.10 : Couplage glycosidique utilisant un dérivé bromé.

f) Conclusion

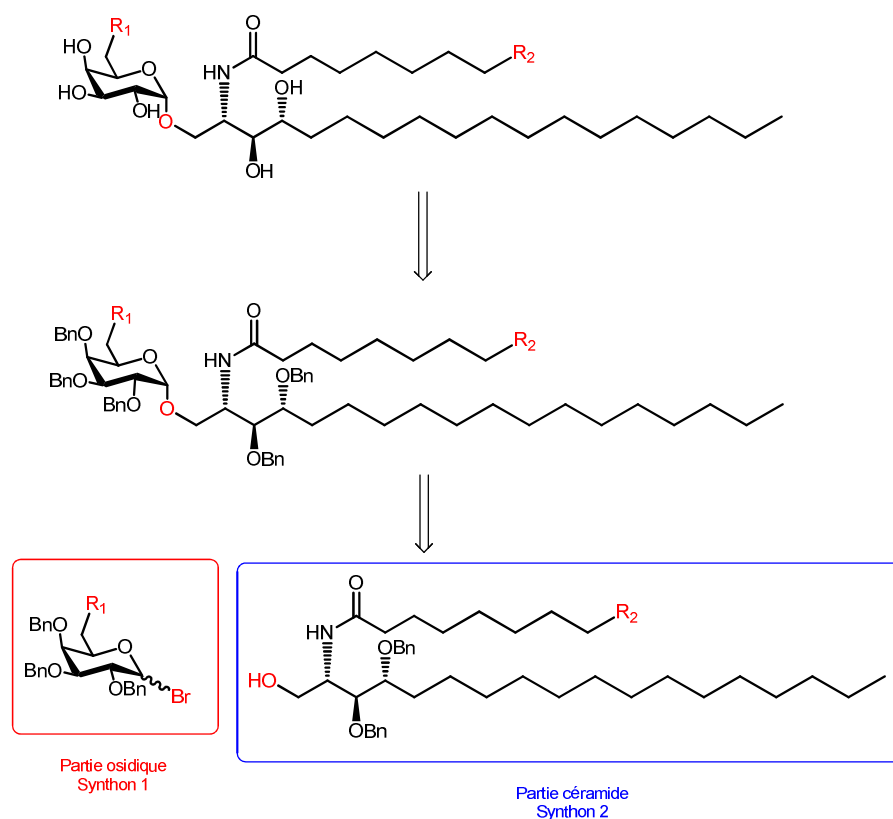
Pour obtenir nos analogues α (O)-GalCer, nous avons utilisé le couplage de Lemieux. Cette méthode peu utilisée a été mise au point au laboratoire par le Dr. Thomann (publication soumise). Elle comporte de nombreux avantages comme le fait qu'elle soit totalement α -sélective (à condition d'utiliser un sucre tetrabenzylé bromé), et ne requiert aucun acide de Lewis supplémentaire. De plus, cette synthèse est reproductible, et permet d'obtenir des rendements de couplages corrects, à l'inverse des autres couplages utilisant des dérivés halogénés qui proposent des rendements plus aléatoires.

Dans la prochaine partie, nous présentons la synthèse de nos différents analogues, avec des dérivés comportant un groupement aromatique sur la chaîne grasse R1 et une fonctionnalisation de la position C6 du sucre par un différents groupements hydrophobes. Le but de ces modifications est d'accroître la spécificité des molécules pour bénéficier d'une réponse pro-Th1. En parallèle, un de nos analogues comportera un groupement PEG₂₀₀₀ en C6, afin de bénéficier d'une molécule gardant son activité et étant soluble dans un solvant aqueux. Pour pouvoir suivre les dérivés *in vivo*, nous avons par ailleurs entrepris la synthèse de molécules ayant un fluorophore en position terminale de la chaîne grasse R1, à l'instar de ce que l'on peut trouver dans la littérature avec le NBD^[155] ou le BODIPY^[156] greffés sur la chaîne R1.

C) Résultats et discussions

1) Préambule

La figure II.2 représente le schéma rétro-synthétique pour obtention de nos analogues d' α -(O)-GalCer. Le synthon 1 représente la partie osidique, le synthon 2 représente la partie céramide. Vu que nous souhaitons obtenir deux familles d'analogues, les synthons 1 et 2 vont être synthétisés en deux exemplaires, une première fois pour les analogues KRN-Phe et une deuxième fois pour les analogues KRN-fluorophore.



R1 : -OH ; N₃ ; NH₂ / R2 : chaîne grasse variable

Figure II.2 : Stratégie rétro-synthétique générale pour l'obtention de nouveaux analogues.

2) Synthèse de nouveaux analogues du KRN7000

a) Synthèse du synthon 1, la partie osidique

a.1) Synthèse du 1-acétyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranose

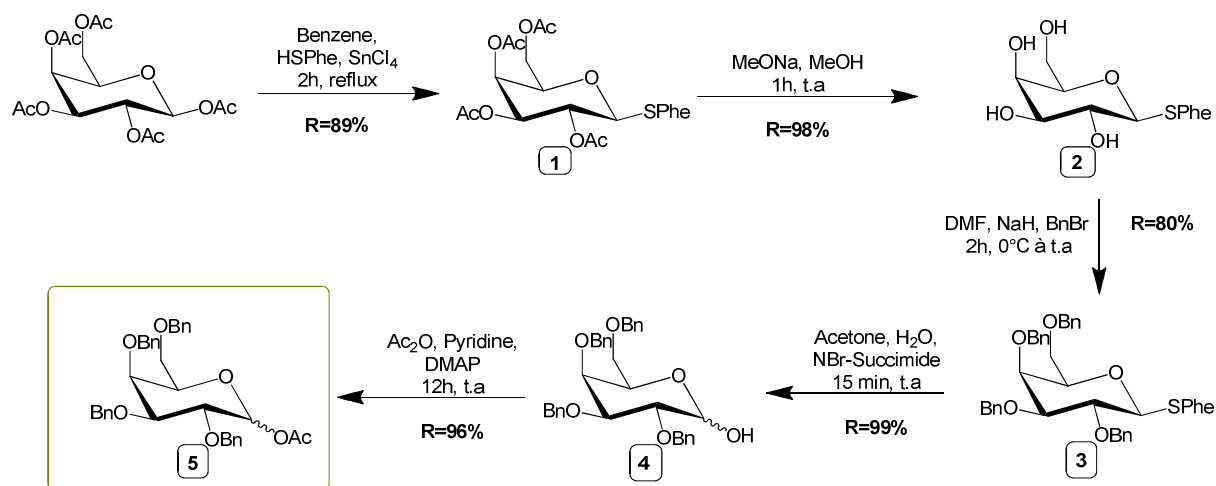


Schéma II.11 : Synthèse du 1-acétyl-2, 3, 4, 6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranose.

L'obtention du composé D-galactose perbenzylé iodé ou fluoré sous forme pyranose est bien décrit dans la littérature.^[157, 158] Ces synthèses nous donc ont permis de concevoir notre synthon glycosidique, comme illustré sur le schéma II.11. Le β -D-galactose peracétylé réagit en présence de tetrachlorure d'étain (SnCl_4), avec le thiophénol (HSPhe) pour conduire au composé **1** sous sa forme β . La sélectivité de cette réaction est générée par l'assistance anchimérique de l'acétate présent en position 2. Les acétates sont ensuite transesterifiés par du méthanolate de sodium en proportion catalytique dans du méthanol (on parle de méthanolyse). Le produit **2** est ensuite benzylé en position 2, 3, 4 et 6 par une réaction de Williamson pour conduire au composé **3**. Le groupement thiophényle est ensuite clivé en présence de N-bromosuccinimide et d'eau pour générer le composé **4** sous forme d'un mélange d'anomères α et β -OH. Ce mélange est ensuite acétylé en présence d'anhydride acétique pour donner le produit **5** également sous forme d'un mélange α et β . L'obtention de ces anomères n'est pas contraignante car le couplage de Lemieux peut se faire quel que soit l'anomère acétylé obtenu. On peut noter que les rendements obtenus pour les différentes étapes sont très bons avec des taux généralement proches de 90%. Le rendement global de cette synthèse de 5 étapes est de 66%.

a.2) Synthèse du 1-thiophenyl-2, 3, 4-tri-O-benzyl -6-azido-6-deoxy- β -D-galactopyranose.

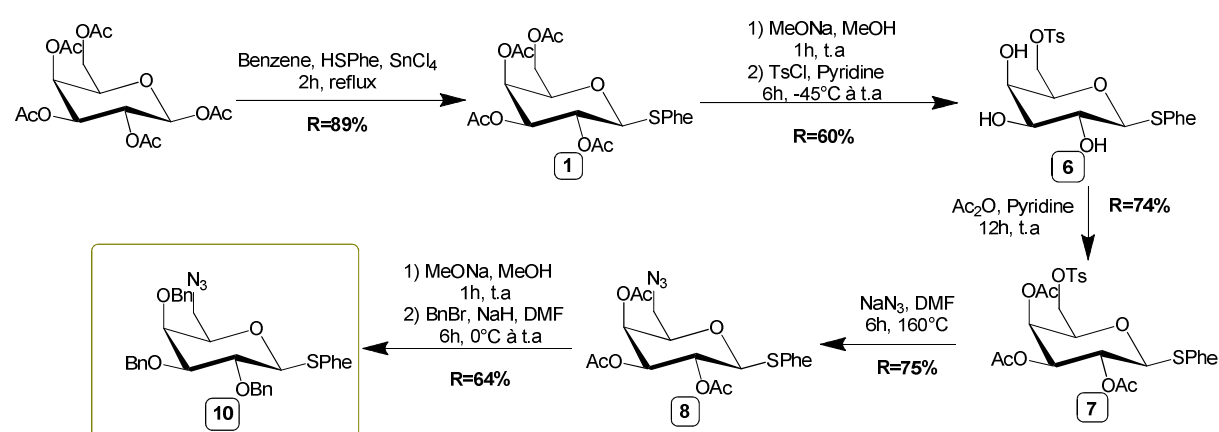


Schéma II.12 : Synthèse du 1-thiophenyl-2, 3, 4-tri-O-benzyl -6-azido-6-deoxy- β -D-galactopyranose.

Pour commencer, le β -D-galactose peracétylé réagit en présence de tetrachlorure d'étain, avec le thiophénol pour conduire au composé **1** sous sa forme β , avec un rendement de 89%. Pour obtenir le produit **6**, on effectue ensuite une méthanolyse des acétates, avant de

fonctionnaliser la position C6 du galactose par un groupement tosylate pour un rendement de 60% pour ces deux étapes. Ce rendement s'explique par le fait que la tosylation de l'alcool primaire n'est pas parfaite (traces de tosylation sur les autres hydroxyles libres du sucre). Pour isoler le produit mono-tosylé en C6, le produit **6** est acétylé pour donner le produit **7**, ce dernier étant plus facile à purifier sur colonne de chromatographie. Le produit **7** est isolé avec un rendement de 74%. La prochaine étape est une réaction S_N2 , qui va permettre de substituer le groupement tosylate par un groupement azide (composé **8**), avec un rendement de 75%. La fin de la réaction consiste en la méthanolyse des acétates, puis une réaction de Williamson permet de benzyler notre galactose pour obtenir le produit **10** avec un rendement de 64% pour ces deux étapes. Le rendement global de cette synthèse est de 19%.

Par rapport à la synthèse précédente, nous n'allons pas générer l'acétate en position anomérique, car d'une part cela rallongerait encore de deux étapes cette synthèse, et d'autre part, il nous sera possible de générer le sucre bromé à partir du sucre thiophényle. En effet, suivant le protocole de Szabó *et al.*, le sucre bromé en position anomérique est généré par une réaction S_N2 en présence de dibrome (Br_2), qui va permettre de substituer le thiophényle par un brome.^[159]

b) Synthèse du synthon 2, la partie céramide

b.1) Synthèse de l'aldéhyde de Garner

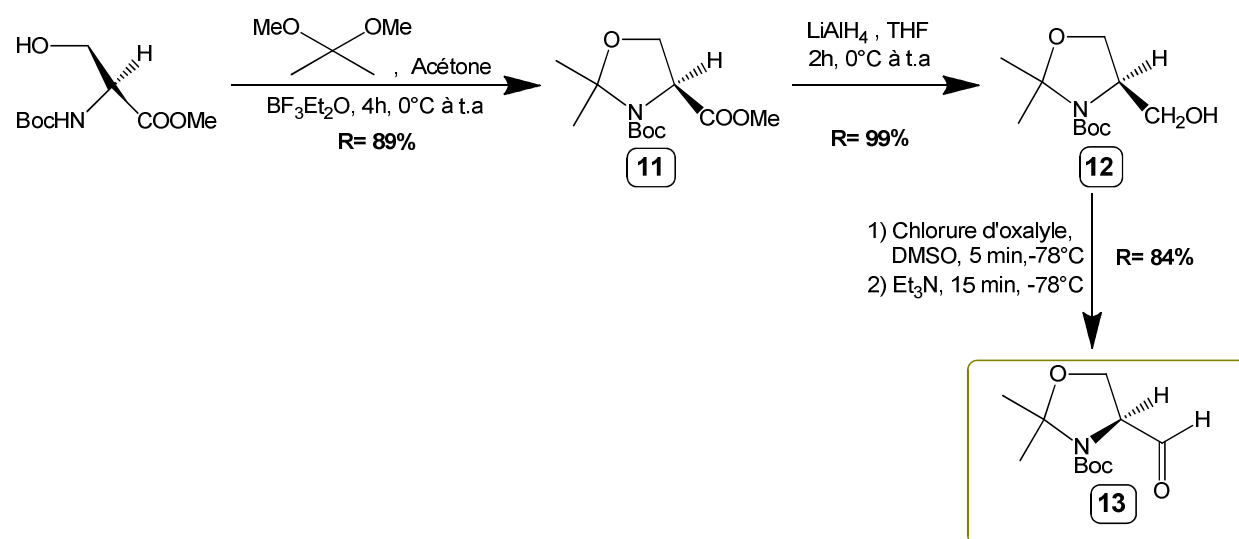


Schéma II.13 : Synthèse de l'aldéhyde de Garner.

L'aldéhyde de Garner est le précurseur de la partie céramide. Il a été synthétisé car il porte le carbone C2' de la partie céramide avec la bonne configuration attendu, à savoir un carbone (S).

Le cycle oxazolidine de l'aldéhyde de Garner est formé par un acétal liant le carbamate et l'alcool primaire du produit commercial N-Boc méthyl sérinate. On obtient ainsi le composé **11** avec un rendement de 89%, qui est réduit en présence de LiAlH_4 pour donner l'alcool **12** quasi quantitativement. L'aldéhyde de Garner **13** est obtenu par une oxydation de Swern du composé **12** avec un bon rendement de 84% (Schéma II.13). Le rendement global est ici de 74%. Il est également possible d'obtenir directement l'aldéhyde de Garner à partir de l'ester **11** en utilisant le réducteur DIBAL-H.^[160] Mais avec cette méthode les rendements sont plus faibles (rendement global de 58%).

b.2) Synthèse de la partie céramide des analogues du KRN7000

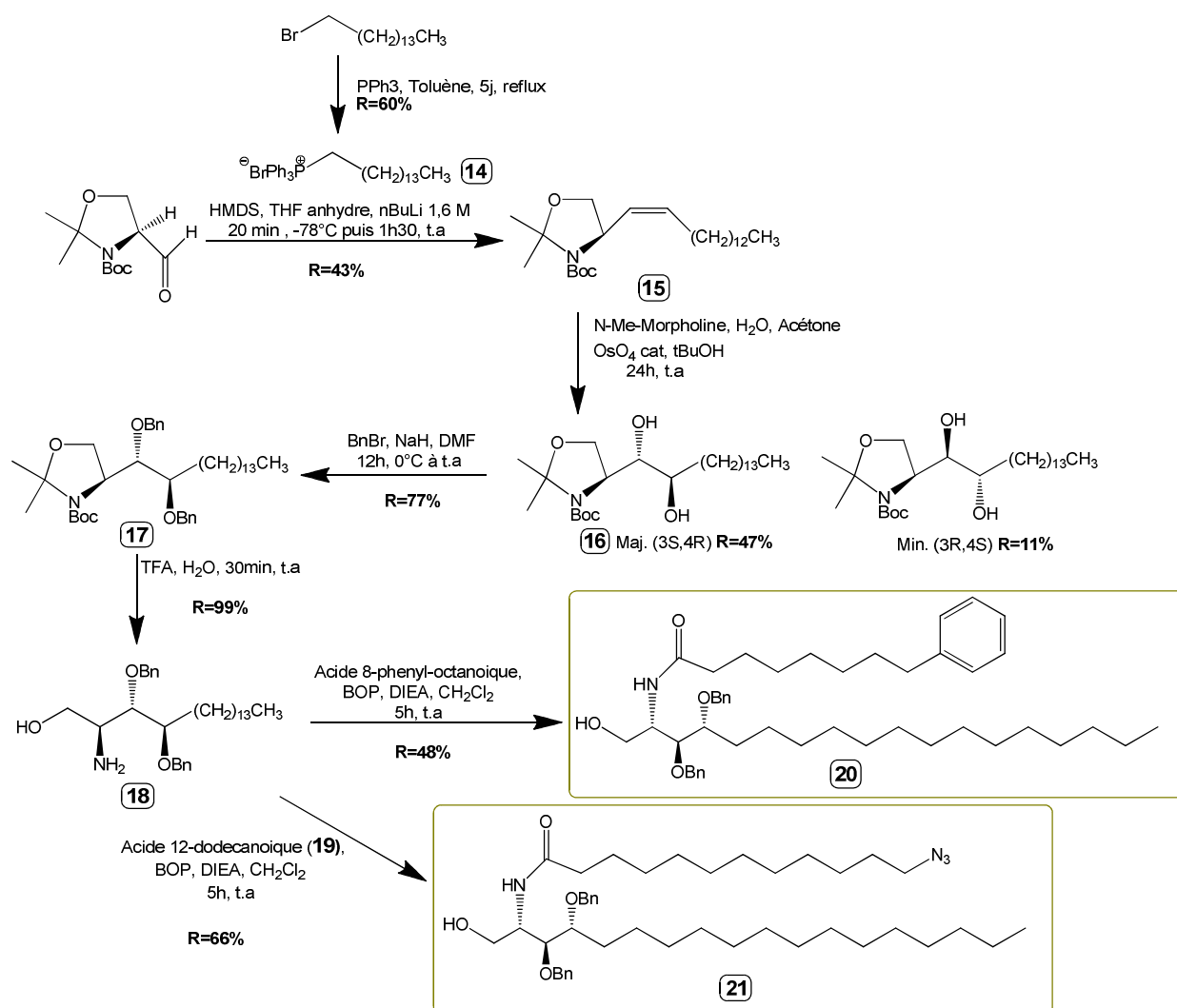


Schéma II.14 : Synthèse des céramides 20 et 21

La synthèse décrite sur le schéma II.14 est basée sur le protocole publié en partie par Azuma *et al.*^[145] La première étape consiste en l'insertion de la chaîne grasse par une réaction de Wittig sur l'aldéhyde de Garner. Le bromopentadécane et de la triphénylphosphine sont mis en solution pour générer le sel de phosphonium **14**. Cette réaction est longue puisque le milieu est laissé 5 jours sous reflux de toluène. L'étape de purification du composé **14** se fait par un lavage avec un mélange cyclohexane/éther (1/1). A noter que ce produit est très hygroscopique. L'étape suivante est une réaction de Wittig qui va nous conduire à l'alcène **15** sous sa forme majoritaire Z (le rapport Z/E = 9/1). Cette forme est assez difficile à isoler, car l'isomère E co-migre avec notre composé. C'est pourquoi après une première purification sur colonne utilisant un gradient cyclohexane/acétate d'éthyle 40/1 à 20/1, on effectue une

deuxième colonne avec uniquement le toluène comme éluant. Cela permet d'avoir une meilleure séparation des deux isomères (rendement de 43% pour l'isomère Z majoritaire).

La suite de la réaction est une dihydroxylation de la double liaison du composé **15**. On utilise pour cela le tétroxyde d'osmium (OsO_4) en condition catalytique, généré dans le milieu par de l'oxyde de N-méthyl morpholine (NMO). En considérant la liaison double dans un plan, l'addition des fonctions hydroxyles peut se faire aussi bien par l'avant que par l'arrière. Les conditions mises au point par Sharpless *et al.* permettent d'induire une réaction sélective, en utilisant de l'AD-mix α ou l'AD-mix β pour favoriser la formation des dérivés 3S, 4R ou 3R, 4S respectivement.^[161] La réaction d'Azuma (OsO_4 , NMO) est déjà partiellement stéréosélective car elle donne majoritairement le diastéréoisomère désiré : 2S, 3S, 4R / 2S, 3R, 4S (rapport 4.5 : 1). Il semble que l'encombrement stérique généré par le cycle oxazolidine soit un inducteur chiral intramoléculaire qui suffise à induire la formation majoritaire du diastéréoisomère désiré. La séparation des deux diastéréoisomères peut se faire sur colonne de chromatographie, avec un rendement de 47% pour l'isomère 3S, 4R et 11% pour l'isomère 3R, 4S. Le produit majoritaire **16** contient ainsi les carbones C2' et C3' sous la configuration attendu, à savoir des carbones (S).

L'étape suivante consiste à protéger les deux fonctions hydroxyles par un groupement benzyle, car d'une part c'est une fonction résistante aux composés acides utilisés lors de l'étape suivante, et d'autre part ce groupement est identique à celui utilisé sur notre synthon saccharidique, ce qui permettra pour l'obtention de la molécule finale, d'effectuer une seule étape d'hydrogénation pour enlever tous les groupements protecteurs. On obtient ainsi le composé **17** avec un rendement quantitatif.

Lors de l'étape suivante, la fonction *tert*-butyl-carbonate (Boc) et le cycle oxazolidine sont hydrolysés en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) afin d'obtenir l'amine libre **18**. Pour obtenir notre céramide complète, nous avons couplé *via* un couplage peptidique utilisant l'activateur BOP en présence de DIEA, soit de l'acide 12-azidododécanoïque **19** (synthétisé en 1 étape à partir de l'acide bromo-dodécanoïque) pour obtenir le produit **21** avec un rendement de 66%, soit de l'acide 8 phényl- octanoïque pour obtenir le produit **20** avec un rendement de 48%. Les rendements globaux sont de 9% pour la synthèse du produit **21**, et de 7% pour le produit **20**. Ces rendements faibles illustrent la difficulté à obtenir ces produits, notamment lors des étapes de purifications des isomères pour les produits **15** et **16**.

c) Couplage de Lemieux

c.1) Mécanisme réactionnel du couplage de Lemieux

Pour pouvoir effectuer le couplage entre notre partie glycosidique et notre partie céramide, nous devons respecter certains protocoles de synthèse pour notre synthon glycosidique. Comme l'illustre Lemieux dans sa publication,^[153] la réaction qui a lieu entre le sucre et l'alcool présent sur la céramide est de type S_N2 . Ce type de réaction impliquant un changement de conformation, si l'on souhaite obtenir un sucre couplé en α , le dérivé bromé doit être sous la forme β pour l'alcool puisse attaquer par la face α .

C'est pour cela que Lemieux *et al.* ont utilisé l'agent de transfert de phase TBABr, car il va permettre d'orienter le dérivé bromé du sucre vers la forme β désirée par excès d'ion Br^- , permettant ainsi à la molécule d'alcool d'effectuer la S_N2 (Schéma II.15).

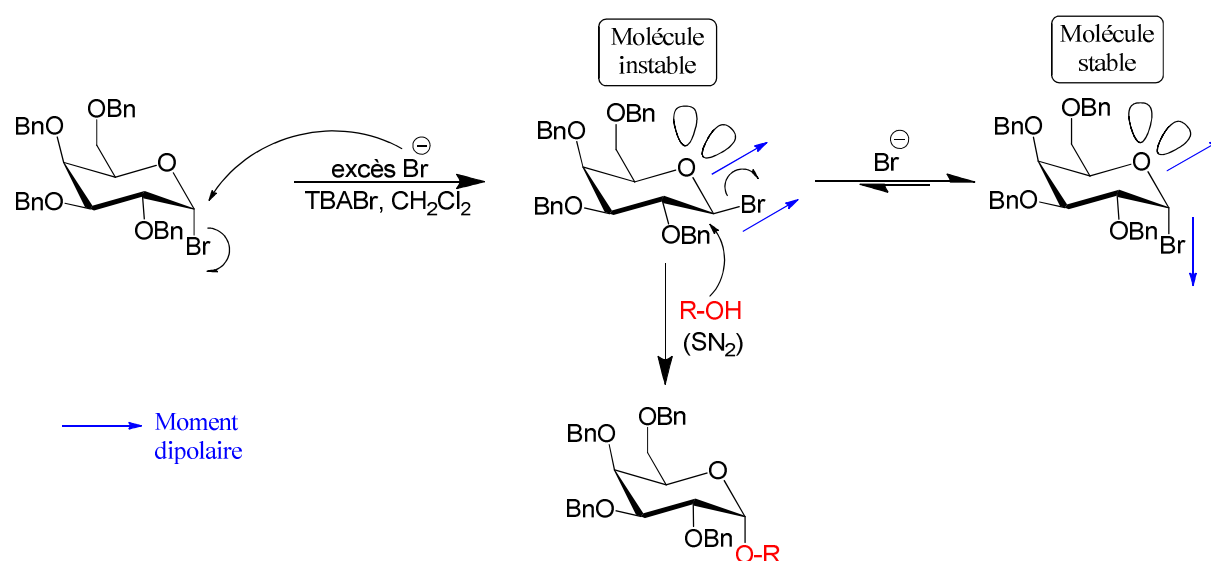


Schéma II.15 : Mécanisme du couplage de Lemieux.^[153]

Le deuxième impératif est de protéger les hydroxyles du sucre par des groupements protecteurs utilisant une liaison de type éther, comme c'est le cas avec nos groupements benzoyles présents sur la partie osidique et sur la céramide. En effet, ces groupements ne participent pas à l'assistance anchimérique pouvant se produire entre la position anomérique et la position 2 du sucre. À l'inverse des groupements protecteurs de type ester comme les acétates. Le schéma II.16 illustre ce qui se passe lorsque ce genre de composé est utilisé. Grâce à l'assistance, on favorise la formation d'une liaison β entre le sucre et le nucléophile.

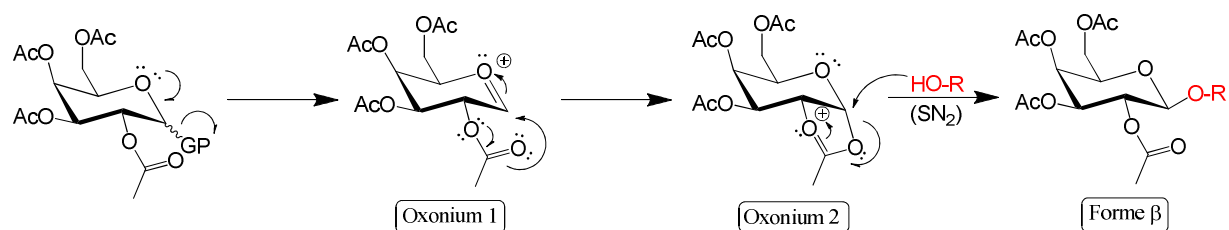


Schéma II.16 : Obtention de la forme β du dérivé galactosidique.

c.2) Synthèse des produits 22 et 26 via le couplage de Lemieux

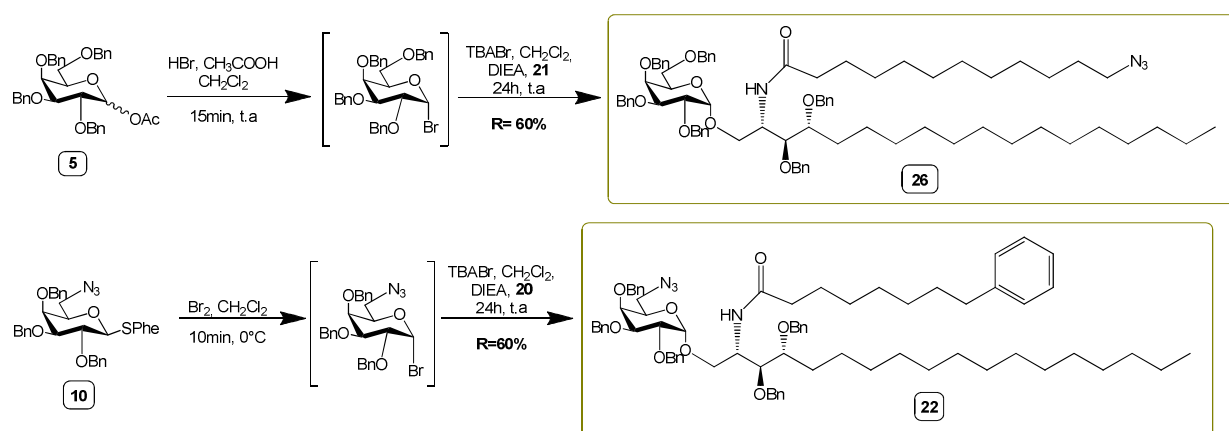


Schéma II.17 : Couplages de Lemieux

Le schéma II.17 illustre les couplages des synthons glycosidiques **5** et **10** préparés extemporanément, sur les céramides **26** et **22** respectivement en utilisant la méthode décrite par Lemieux.^[153] Comme présenté plus haut, il nous faut tout d'abord générer le dérivé galactosyl perbenzylé bromé. Nous avons utilisé pour cela deux méthodes, la première utilisant le galactosyl perbenzylé acétylé, la seconde découverte plus tard, utilisant le galactosyl perbenzylé thiophényle. Cette deuxième méthode a l'avantage de réduire de deux étapes l'obtention du galactose perbenzylé désiré par rapport à la première méthode.

Pour la première méthode (galactose perbenzylé acétylé **5**) nous avons utilisé du bromure d'hydrogène (HBr) dans l'acide acétique en conditions anhydres. Les dérivés bromés du galactose étant instables, les produits sont isolés par évaporation du solvant en présence de toluène anhydre, puis mis à sécher sous vide.^[162] Le produit obtenu est dissous dans du dichlorométhane en présence de tamis moléculaires (4Å). Le sel de bromure de tétrabutylammonium est alors ajouté pour créer l'équilibre entre la forme α et la forme β du

dérivé bromé. La céramide **21** ainsi que de la DIEA sont ajoutées au milieu réactionnel, laissé sous agitation à reflux et sous argon pendant 24 heures.

La deuxième méthode (galactose perbenzylé thiophénylé **10**) utilise du dibrome dans du dichlorométhane anhydre. On agite en présence de tamis moléculaire 4Å pendant 30 min à 0°C.^[159] Après cela, le tétrabutylammonium est ajouté, puis la céramide **20** en présence de DIEA. Le milieu réactionnel est laissé pendant 24h à température ambiante.

La méthode de Lemieux n'utilise « que » 3 équivalents de sucre en comparaisons des 5 équivalents utilisés pour le couplage de dérivés saccharidiques iodés. Enfin, les conditions de réaction sont faciles à mettre en œuvre et sont reproductibles avec de bons rendements.

Maintenant que les composés **22** et **26** sont obtenus, nous allons pouvoir synthétiser nos deux familles d'analogues du KRN7000. Nous voyons donc dans un premier temps la synthèse des analogues KRN-Phe, puis dans un second temps la synthèse des analogues KRN-fluorophore.

d) Synthèse des analogues KRN-Phe

d.1) Obtention du KRN-Phe-Tet

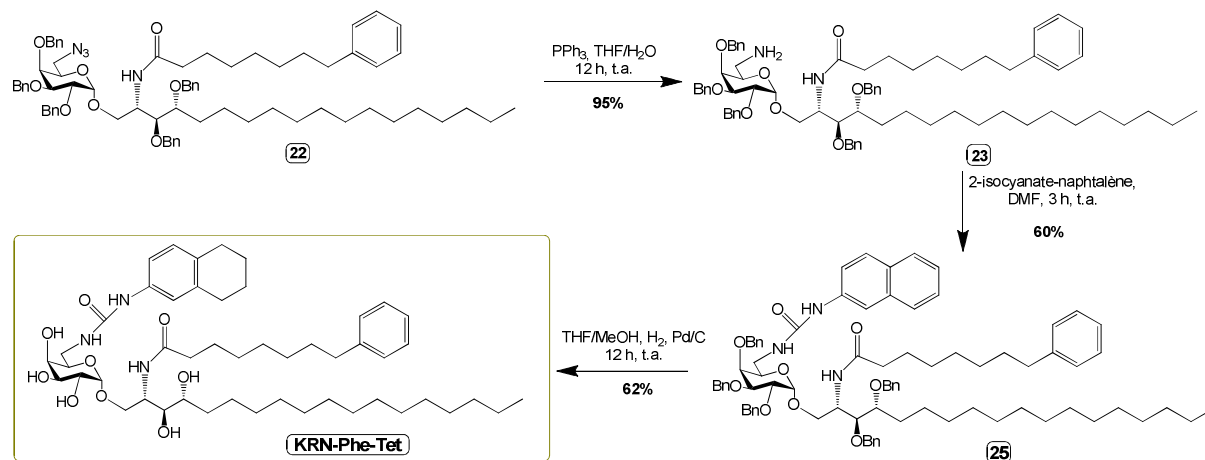


Schéma II.18 : Obtention du KRN-Phe-Tet.

Ce composé a été obtenu de manière fortuite à partir du composé **22** obtenu sur le schéma II.17 lors du couplage de Lemieux. Celui-ci a été mis en présence de PPh₃ et d'un mélange THF/H₂O pour réduire la fonction azide en fonction amine primaire. On obtient ainsi le produit **23**, dont la fonction amine va réagir avec du 2-isocyanate-naphtalène pour conduire au produit **25** avec un rendement de 60%. Ce produit étant encore benzylé, nous l'avons mis

dans un mélange THF/MeOH sous atmosphère d'H₂ à 1 bar pendant une nuit. Le résultat obtenu et illustré sur le schéma II.18, nous a montré que nous avons effectivement clivé nos benzyles, mais nous avons aussi dégradé le naphthalène en tétraline. Le produit KRN-Phe-Tet est obtenu avec un rendement de 62% (32 mg).

Afin d'éviter de dénaturer le groupement aromatique présent sur la position C6 du sucre lors de l'étape d'hydrogénation, nous avons pris une voie de synthèse légèrement différente, à savoir que nous avons choisi de protéger d'abord l'amine primaire en C6.

d.2) Obtention du KRN-Phe-Boc

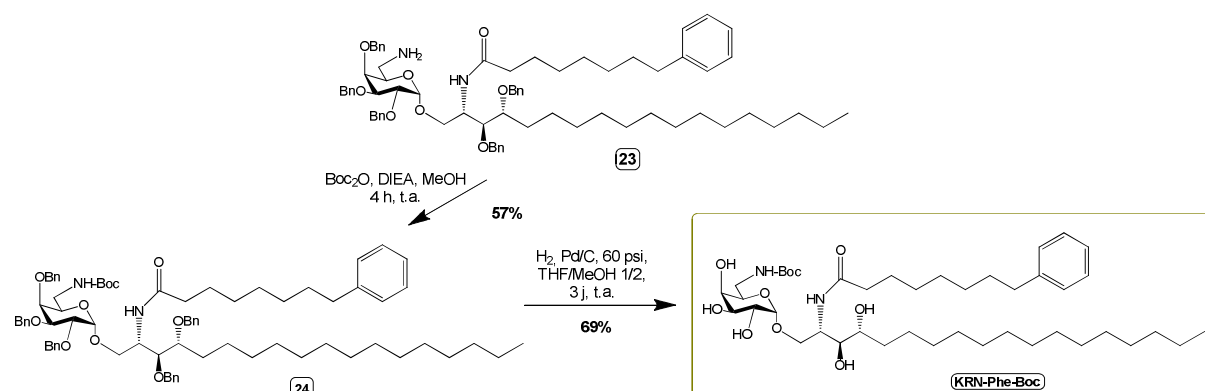


Schéma II.19 : Obtention du KRN-Phe-Boc.

Sur le schéma II.19, nous partons du produit **23**. L'amine primaire est protégée par un groupement Boc pour donner le produit **24**. Ce produit est ensuite débenzylé sous une atmosphère d'hydrogène à 60 psi pendant 3 jours, en présence de Palladium sur charbon, pour conduire au produit **KRN-Phe-Boc** avec un rendement de 69% (24 mg).

d.3) Obtention du KRN-Phe-NH₂

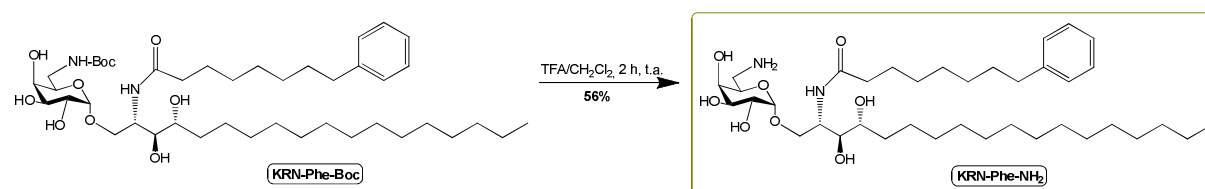


Schéma II.20 : Obtention du KRN-Phe-NH₂ à partir du KRN-Phe-Boc.

Le schéma II.20 illustre le KRN-Phe-NH₂ qui est obtenu par clivage du Boc présent sur le produit KRN-Phe-Boc et régénération de l'amine primaire. Le produit KRN-Phe-NH₂ est obtenu avec un modeste rendement de 56% (16 mg). Ce rendement modeste pour un clivage de groupement Boc, peut être le résultat de l'agrégation de notre produit avec la silice utilisée lors de l'étape de purification sur colonne de silice.

d.4) Obtention des KRN-Phe-Naph et KRN-Phe-PEG₂₀₀₀

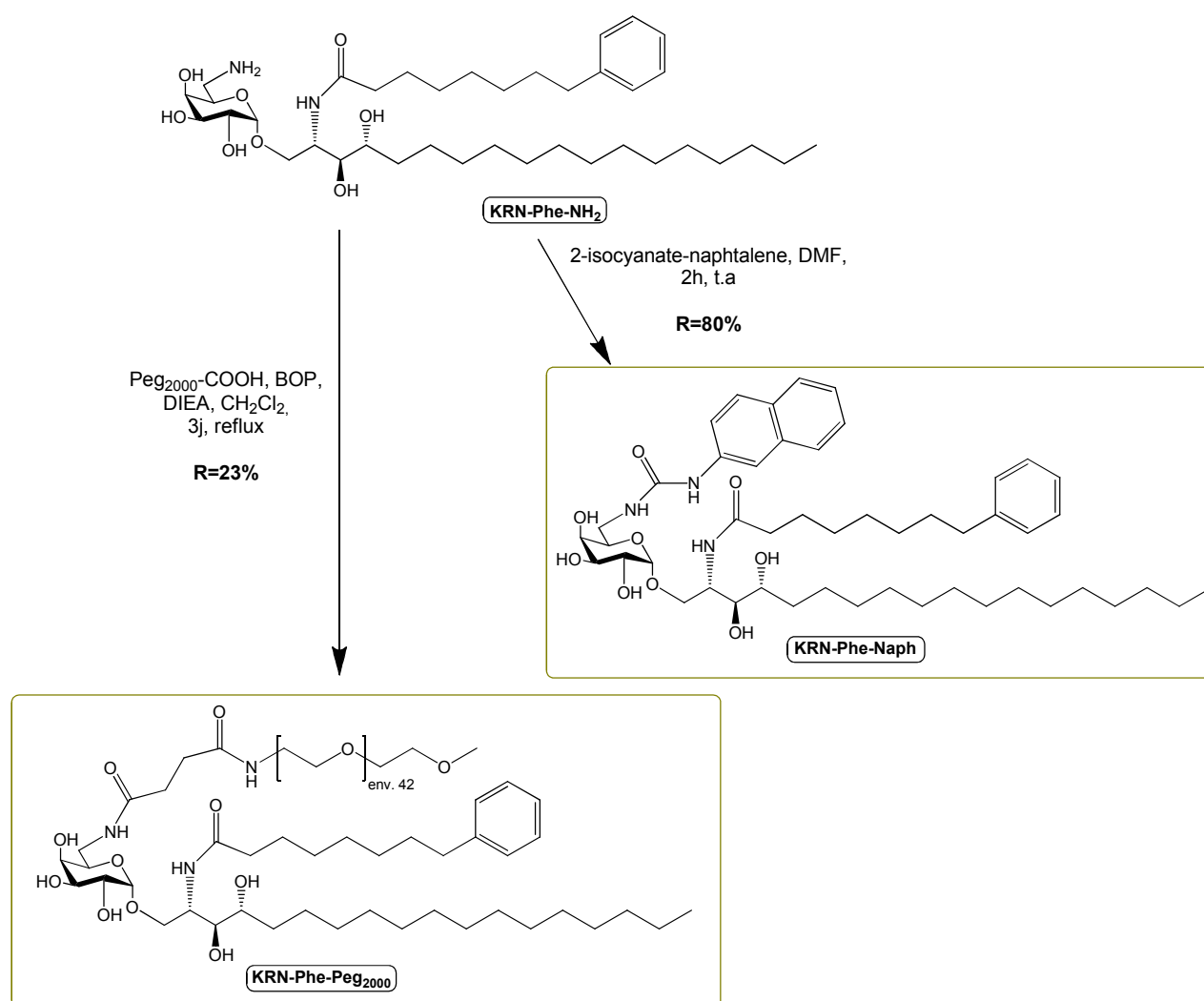


Schéma II.21 : Obtention des produits KRN-Phe-Naph et KRN-Phe-PEG₂₀₀₀.

Comme l'illustre le schéma II.21, le produit KRN-Phe-Naph est obtenu en faisant réagir l'amine du KRN-Phe-NH₂ avec le 2-isocyanate-naphtalène dans de la DMF pendant 2h à température ambiante. Le KRN-Phe-Naph est obtenu avec un rendement de 80% (5 mg).

Le produit KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ est obtenu par réaction de l'amine KRN-Phe-NH₂ dans du CH₂Cl₂ avec une molécule d'acide de polyéthylène glycol (n≈42), en présence de BOP et de DIEA. Le milieu est laissé à reflux pendant 3 jours. Le produit KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ est obtenu avec un rendement de 23% (4 mg). Ce rendement faible se justifie par la taille du groupement PEG₂₀₀₀ et par sa structure non linéaire, rendant difficile l'attaque nucléophile de l'amine en C6 sur le carbonyle portant la fonction acide du PEG₂₀₀₀-COOH.

e) Synthèse des analogues KRN-fluorophore

e.1) Synthèse du produit 29, précurseur des analogues KRN-fluorophores

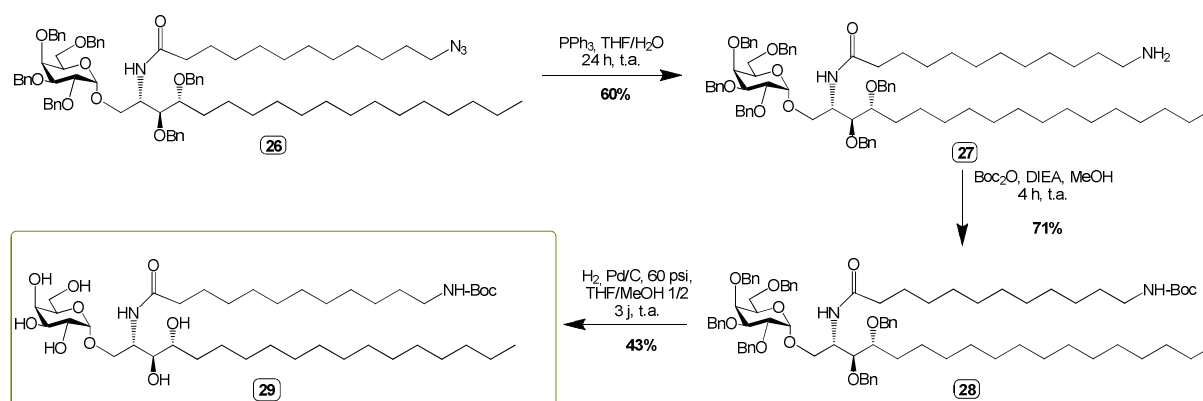


Schéma II.22 : Etapes de débénzylation pour l'obtention du produit 29, précurseurs des analogues fluorescents.

La déprotection du composé **26** est précédée par une étape de réduction de la fonction azide. En effet, sous une atmosphère d'hydrogène, l'azide est réduite en amine primaire qui a tendance à empoisonner le catalyseur (Palladium) et ainsi empêcher la débénzylation. Vu le nombre important de fonctions benzyles présentes sur nos molécules, nous choisissons tout d'abord de réduire l'azide en amine primaire par une réaction de Staundinger.

Ainsi l'azide du produit **26** est réduite en amine primaire pour donner le produit **27** avec un rendement de 60%. Cette amine est protégée par un groupement Boc avec un rendement de 71% pour donner le produit **28**. Ce dernier est ensuite débénzylé sous une atmosphère d'hydrogène à 60 psi pendant 3 jours, en présence de Palladium sur charbon. Le produit **29** présenté sur le schéma II.22 est obtenu avec un rendement modeste de 43%.

e.2) Obtention des KRN-FITC et KRN-Cy5

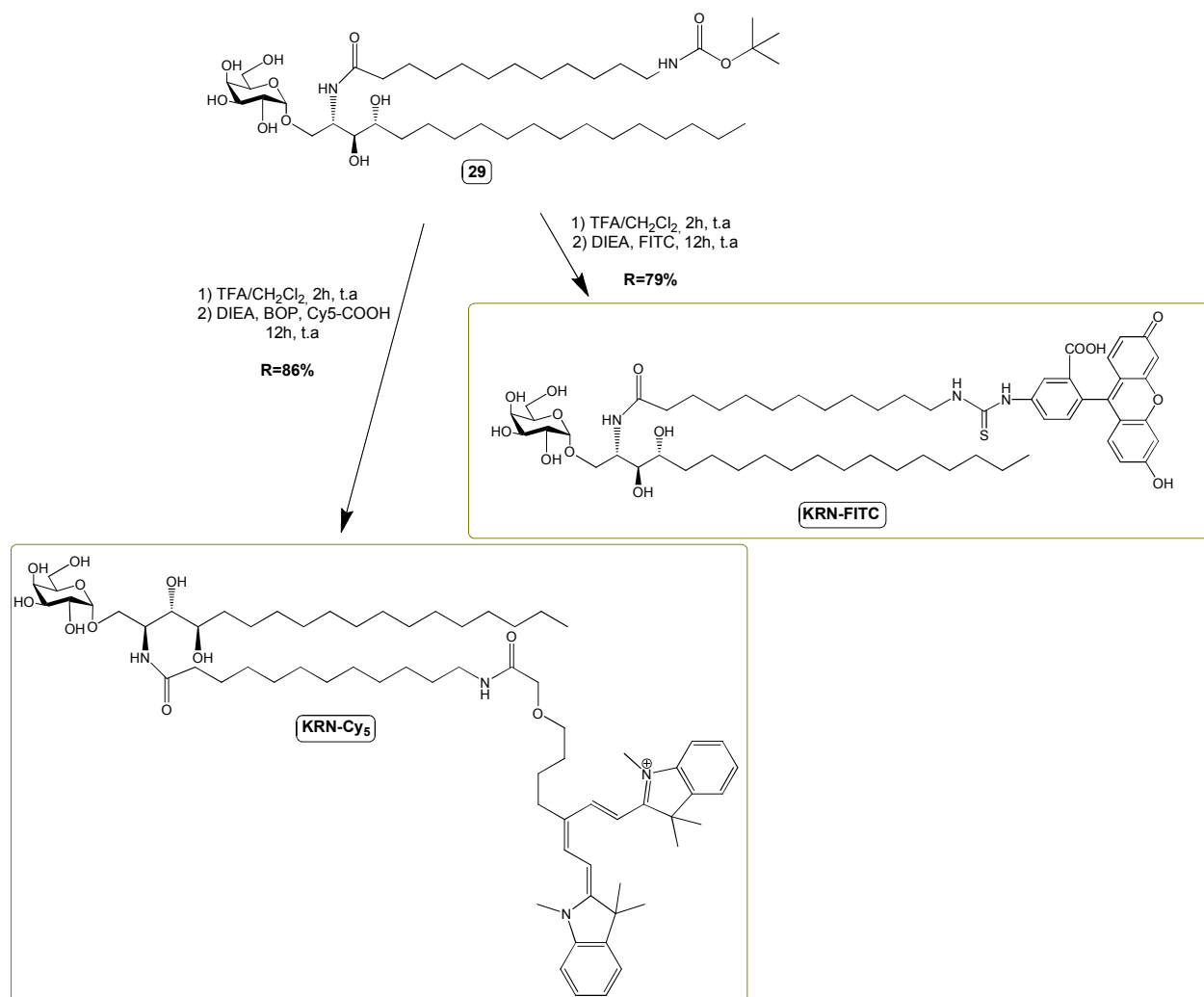


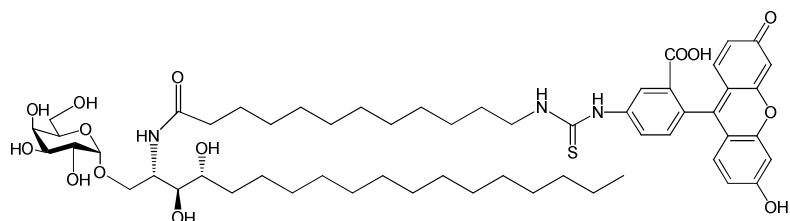
Schéma II.23 : Obtention des molécules KRN-FITC et KRN-Cy5

Pour obtenir les molécules KRN-FITC et KRN-Cy5, il a d'abord fallu régénérer l'amine primaire sur la molécule **29**. Pour cela ce composé est mis en présence d'un mélange TFA/CH₂Cl₂ 1/1 pendant 2h. Après avoir évaporé le solvant, le sel de TFA est repris dans de la DMF en présence de triéthylamine avant d'ajouter la FITC (Fluorescéine-Iso-Thio-Cyanate). Le milieu est laissé sous agitation pendant 12h à l'abris de la lumière, pour donner le produit KRN-FITC avec un rendement de 79% (17 mg). Pour le produit KRN-Cy5, le sel de TFA du composé est repris dans du CH₂Cl₂ en présence de DIEA. En parallèle, du Cy5-COOH (synthétisé par le Dr. Lebeau, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR7199) en présence de BOP est laissé sous agitation quelques minutes, avant d'ajouter le sel de TFA dans le CH₂Cl₂ et la DIEA. Le milieu est laissé une nuit sous agitation à l'abris de la lumière, pour donner le produit KRN-Cy5 avec un rendement de 86% (14 mg).

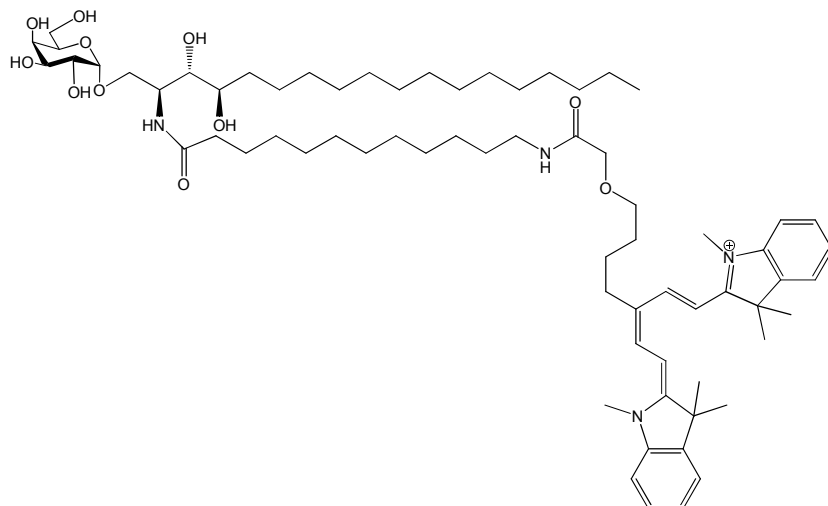
D) Conclusion

Ci-dessous sont rappelées les structures des différents analogues synthétisés au laboratoire, ainsi que les rendements globaux obtenus pour chacun des analogues :

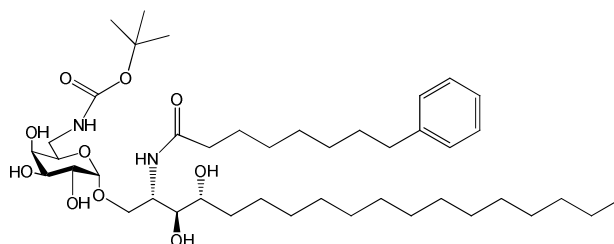
- **KRN-FITC** (Rendement global : 0,3 %) :



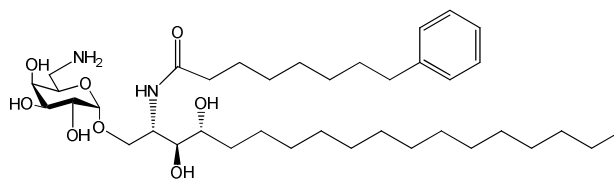
- **KRN-Cy5** (Rendement global : 0,3 %) :



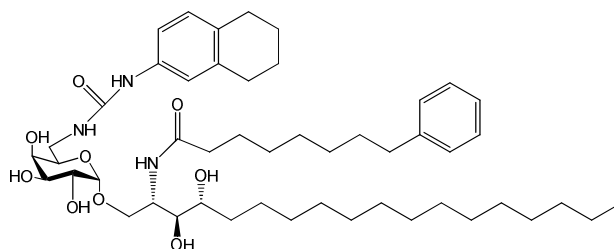
- **KRN-Phe-Boc** (Rendement global : 0,6 %) :



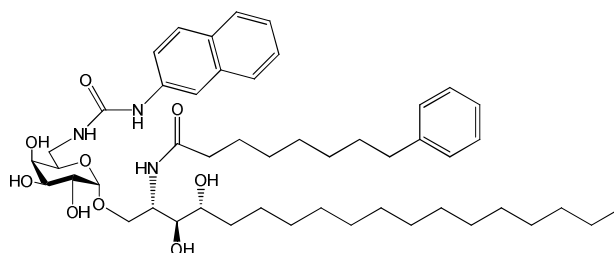
- **KRN-Phe-NH₂** (Rendement global : 0,3 %) :



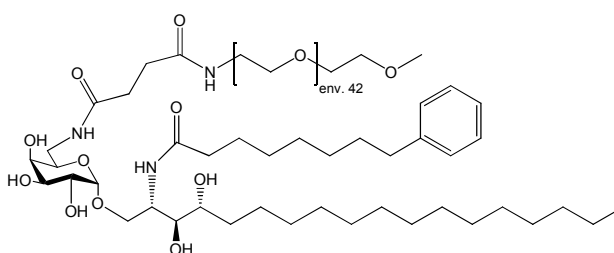
- **KRN-Phe-Tet** (Rendement global : 0,6 %) :



- **KRN-Phe-Naph** (Rendement global : 0,2 %) :



- **KRN-Phe-PEG₂₀₀₀** (Rendement global : 0,07 %) :



Les produits synthétisés ont tous été obtenus avec des rendements globaux très faibles, mais comparables à ceux observés dans la littérature, traduisant de nombreuses étapes pour obtenir les produits désirés (environ 20 étapes sont nécessaires pour obtenir nos analogues), avec des purifications souvent difficiles pour isoler le produit désiré du fait de la présence de diastéréoisomères ou de chaînes grasses sur nos analogues.

Tous nos analogues ont été synthétisés en utilisant d'une part l'aldéhyde de Garner comme précurseur de la partie céramide, et d'autre part la méthode de Lemieux pour coupler nos parties glycosidiques à nos céramides de manière α -sélective, et ce de façon reproductible,

quelque soit la céramide ou le type de sucre utilisé. Dans la littérature, peu d'auteurs utilisent ce couplage avec un sucre bromé. On retrouve plus facilement des couplages utilisant des dérivés iodé ou fluoré. Seul Toba *et al.* ont utilisé également cette méthode, avec des rendements assez variables suivant la céramide utilisée,^[154] tout comme d'ailleurs les couplages utilisant les dérivés iodés et fluorés qui présentent également des rendements variables dans la littérature.

Ainsi les composés KRN-FITC et KRN-Cy5 ont été obtenu en formant le sucre bromé grâce à du HBr, alors que les composés KRN-Phe-Boc, KRN-Phe-NH₂, KRN-Phe-Tet, KRN-Phe-Naph et KRN-Phe-PEG₂₀₀₀, ont été obtenus en formant le sucre bromé avec du di-Brome. Cette dernière méthode ayant montré la même efficacité que celle utilisant le HBr, elle permettra de raccourcir la synthèse du sucre bromé de deux étapes par rapport à la méthode utilisé pour les KRN-FITC et KRN-Cy5.

Toutes ces molécules ont été testées par l'équipe du Dr. Trottein lors de différents tests biologiques, afin de connaître leur profil cytokinique. Les résultats des tests sont présentés dans le paragraphe suivant.

II) Activité biologiques de nos analogues

A) Préambule

La synthèse de nos différents analogues du KRN 7000 effectuée, nous avons cherché pour les différentes molécules à en déterminer les propriétés immunologiques. Plusieurs tests ont donc été mis en place par le Dr. Trottein et son équipe, pour identifier les molécules ayant un impact sur la réponse immunitaire. On a ainsi observé *in vitro*, la prise en charge des ligands par des splénocytes de souris, et par des cellules dendritiques présentant le ligand à des cellules iNKTs. A noter que les splénocytes contiennent plusieurs types de cellules immunitaires, comme des cellules NKTs, des cellules présentatrices de l'antigène exprimant la molécule CD1d, ainsi que d'autres précurseurs de cellules immunitaires.

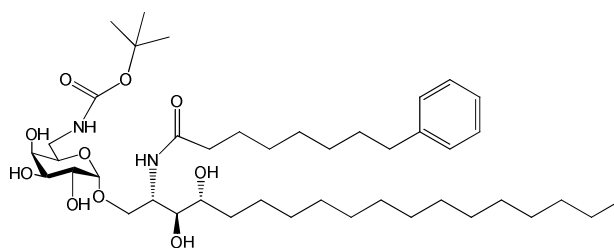
Pour les molécules fluorescentes, outre le fait de valider leur activité, elles ont été utilisées dans un modèle défini pour identifier quels sous-types de DCs prennent en charge le ligand α -GalCer. Le groupe du Dr. François Trottein a mis au point des tests permettant d'étudier les réponses des cellules iNKT murines résultant de la présentation de nos analogues glycolipidiques par la molécule CD1d des DCs. Ces expériences permettent d'identifier les

molécules actives et de comparer leur efficacité par rapport au ligand synthétique de référence, le KRN 7000.

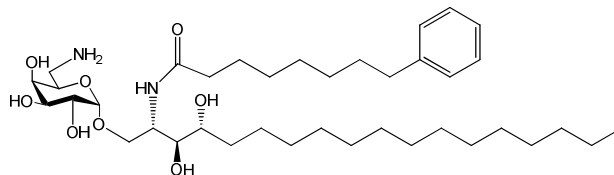
B) Etude biologique de l'activité des analogues KRN-Phe

Cette étude a été réalisée par l'équipe du Dr. François Trottein avec les molécules suivantes :

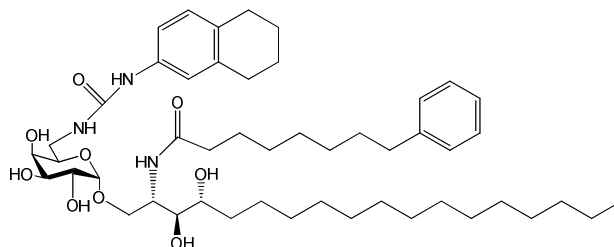
- KRN-Phe-Boc :



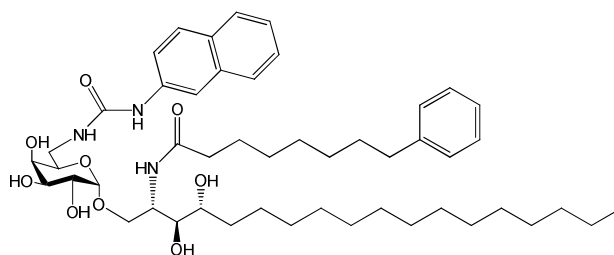
- KRN-Phe-NH₂ :



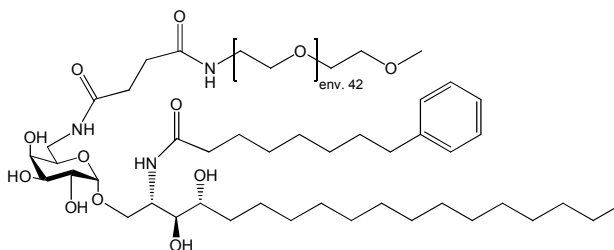
-KRN-Phe-Tet :



- KRN-Phe-Naph :



- KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ :



Dans un premier temps l'étude *in vitro* est effectuée, pour vérifier le profil pro-Th1 de nos molécules, profil favorisant la réponse immunitaire anti-tumorale. Pour le savoir, nous utilisons le KRN7000 comme référence, car il est décrit comme ayant un profil pro-Th1 (ratio IFN- γ /IL-4 > 30 dans notre cas).

Pour l'étude de nos analogues, deux tests sont mis en place. Le premier permet de mesurer l'IL-2 et met en jeu des cellules dendritiques issues de précurseurs de moelle osseuse de souris, et des hybridomes de cellules iNKTs de souris (Schéma II.24 A). Ces dernières sont des cellules activées uniquement de façon CD1d dépendant. Le deuxième test met en jeu des splénocytes de souris, permettant de mesurer les cytokines IFN- γ et IL-4 et donc de connaître le profil de nos analogues grâce au ratio cytokinique (Schéma II.24 B).

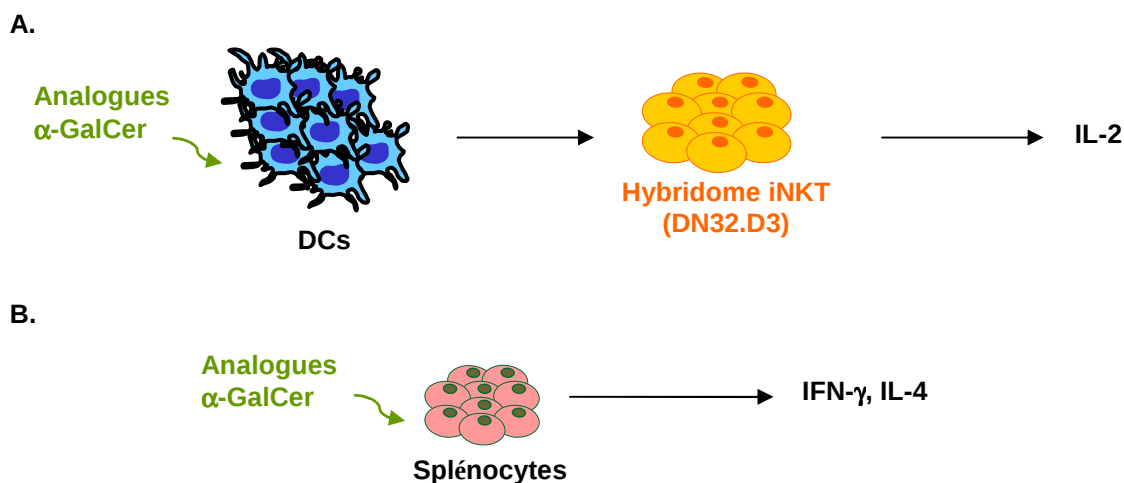


Schéma II.24 : Tests in vitro permettant la quantification et la comparaison de la production de cytokines, en fonction de nos différents analogues.

Les différents analogues synthétisés, KRN-Phe-NH₂, KRN-Phe-Boc, KRN-Phe-Naph, KRN-Phe-Tet et KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ ont été dissous dans du DMSO avant d'être dissous dans du milieu de culture pour obtenir les concentrations désirées. Les concentrations de cytokines sont mesurées par des tests ELISA.

1) Prise en charge des ligands par les hybridomes de cellules iNKT - Résultat et discussion

Dans ce premier test, les analogues sont mis en présence de DCs issues de précurseurs de moelle osseuse (la purification de ces DCs a été publiée par Paget *et al.*^[163]) puis avec des hybridomes de cellules iNKT. La figure II.3 illustre la sécrétion d'IL-2 par les hybridomes en réponse à la stimulation des différents ligands. Les concentrations des analogues sont exprimées en pmol/ml car une différence de masse existe entre le composé pégylé ($M \approx 2800 \text{ g.mol}^{-1}$) et les autres produits synthétisés ($M \approx 800 \text{ g.mol}^{-1}$). Cette différence impose que pour une masse donnée, nous aurions en « nombre », moins de molécules de KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ par rapport aux autres analogues. Pour que les résultats soient comparables, nous devons présenter aux cellules le même « nombre » de molécules de produits synthétisés.

Lors de ce test nous avons voulu également vérifier que l'activité sur la réponse immunitaire n'était pas altérée lorsque le KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ est dissous dans un milieu physiologique. Le résultat est présenté sur la figure II.3.

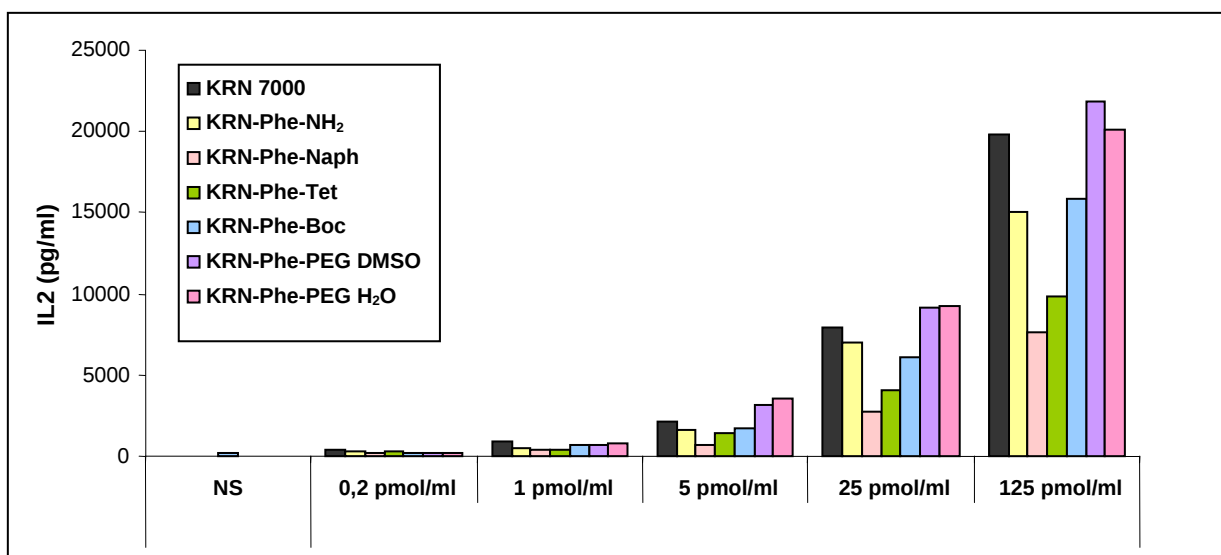


Figure II.3 : Taux de sécrétion d'IL-2 par les hybridomes d'iNKTs.

Le KRN7000 représente toujours notre contrôle positif, ainsi que notre référence. On constate que tous les analogues provoquent une sécrétion de cytokine de manière dose-dépendante. Les KRN-Phe-Naph et KRN-Phe-Tet produisent les taux les plus faibles de cytokine. Les KRN-Phe-NH₂ et KRN-Phe-Boc ont des taux de sécrétion similaires. Le KRN-Phe-PEG₂₀₀₀, dissout dans un tampon physiologique, est aussi actif que la forme dissoute dans du DMSO. Le taux de sécrétion est légèrement supérieur au KRN7000.

Le premier enseignement des résultats est que tous nos analogues sont pris en charge par les hybridomes d'iNKTs. Cela indique que la modification du C6-O de la partie osidique par une amine fonctionnalisable, n'empêche pas *in vitro* la prise en charge du ligand par les DCs, et surtout n'empêche pas la reconnaissance du ligand par le TCR des cellules iNKTs. Dans le détail, on observe des résultats plus mitigés. Les KRN-Phe-Naph et KRN-Phe-Tet semblent être moins bien pris en charge. Ceci pourrait résulter d'un positionnement non optimal des molécules dans les récepteurs, imposé par des phénomènes de « π -stacking » émanant des cycles aromatiques présents d'une part sur les analogues, et d'autre part sur les acides aminés des récepteurs. Des contraintes d'ordre stériques pourraient donc être une hypothèse pour expliquer les résultats de ces deux molécules.

Les KRN-Phe-NH₂ et KRN-Phe-Boc sont pris en charge quasiment aussi bien que le KRN7000. La présence de l'amine primaire ou d'un groupement aliphatique ne gêne pas la reconnaissance des ligands par les cellules immunitaires.

Concernant le KRN-Phe-Peg₂₀₀₀, il possède une activité cytokinique au moins égale à celle du KRN7000. Le fait d'utiliser un tampon physiologique par rapport au DMSO, permet de conserver l'activité de la molécule pégylée, quelque soit la dose utilisée. Le PEG₂₀₀₀

faciliterait ainsi l'administration de la molécule KRN-Phe-Peg₂₀₀₀ *in vivo*, en accroissant sa biodisponibilité et en évitant la toxicité provoquée par les solvants organiques utilisés traditionnellement.

2) Prise en charge des analogues par les splénocytes – Evaluation du profil pro-Th1

Le deuxième test mis en place mesure les taux de cytokines IL-4 et IFN- γ sécrétées par les splénocytes. Ces cellules, qui regroupent plusieurs types de précurseurs de cellules immunitaires (notamment des cellules iNKTs), sont mises en culture avec différentes concentrations d'analogues. Les résultats sont présentés sur la figure II.4.

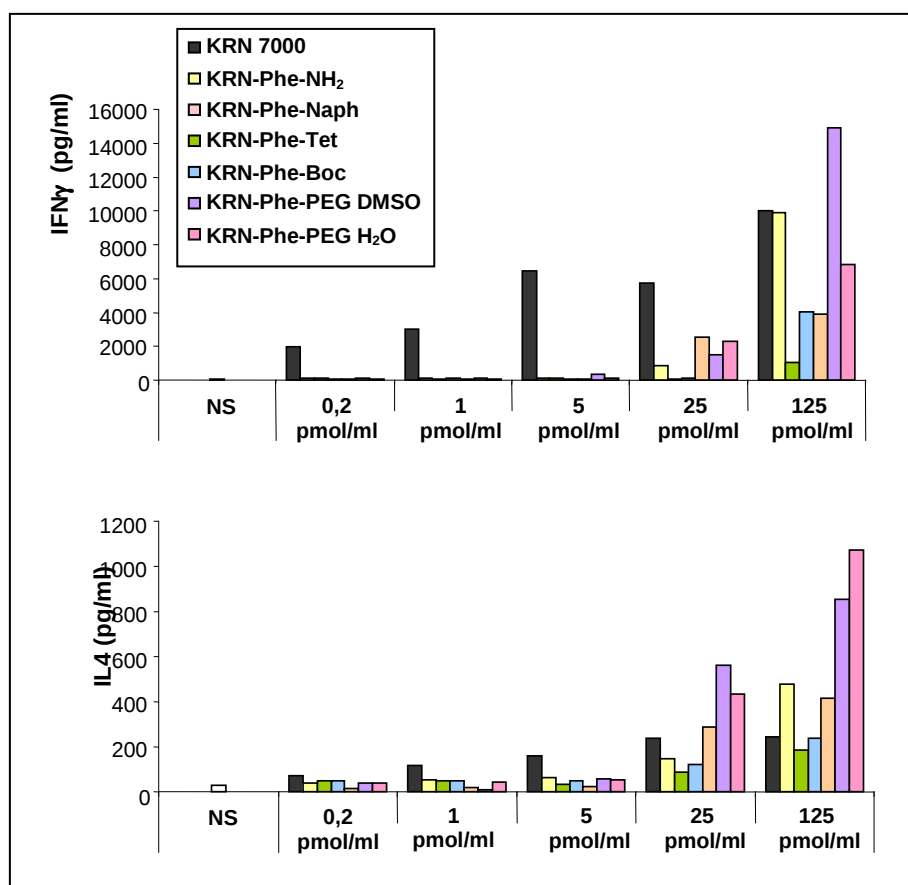


Figure II.4 : Taux de sécrétion des cytokines IL-4 et IFN- γ par les splénocytes par rapport à la concentration molaire des analogues.

Concernant la sécrétion d'IFN- γ , les analogues sont actifs à des doses supérieures à 25 pmol/ml, avec des taux généralement plus faibles que le KRN7000, sauf à 125 pmol/ml où l'on observe pour le KRN-Phe-NH₂ et les KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ des taux proches ou supérieurs au KRN7000.

Pour l'IL-4, les taux de sécrétion sont assez proches du KRN7000 jusqu'à 5 pmol/ml. Au-delà, certains analogues comme les KRN-Phe-PEG₂₀₀₀, le KRN-Phe-Naph ou le KRN-Phe-NH₂, provoquent des taux de sécrétions plus élevés que notre référence.

Le tableau II.1 ci-dessous présente les ratios cytokiniques obtenus pour nos différents analogues, aux concentrations de 25 et 125 pmol/ml, permettant ainsi d'avoir une première approche du profil cytokinique de nos analogues.

Tableau II.1 : Ratio IFN- γ /IL-4 du KRN7000 et de ses analogues.

	Ratio du taux cytokinique IFN- γ / IL-4	
	Ratio à 25 pmol/ml	Ratio à 125 pmol/ml
KRN 7000	30	50
KRN-Phe-NH ₂	5	20
KRN-Phe-Naph	7	10
KRN-Phe-Tet	/	3
KRN-Phe-Boc	1	20
KRN-Phe-PEG DMSO	2	17
KRN-Phe-PEG H ₂ O	5	6

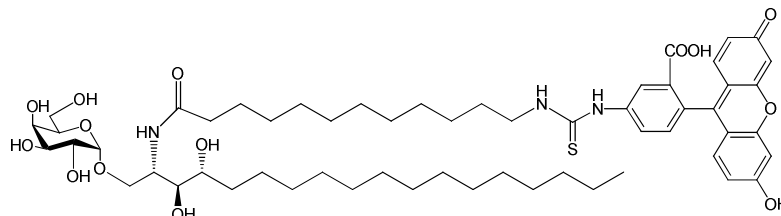
Ce que l'on remarque sur le tableau II.1, c'est le ratio qui a tendance à augmenter avec la hausse de la concentration molaire. Mais ces résultats nous indiquent surtout que le profil de nos analogues pencherait du côté du profil pro-Th2. En effet, en comparant les ratios obtenus par nos différents analogues et ceux pour le KRN 7000 (qui est notre référence pro-Th1), on observe que quelque soit la concentration, les ratios des analogues sont nettement en dessous des valeurs de notre référence. Les composés ayant plutôt une tendance pro-Th2 marquée, sont le KRN-Phe-Tet et le KRN-Phe-PEG dissous dans l'eau, dont les ratios ne dépassent pas la valeur de 6.

Cela signifierait que nos analogues possèdent une stabilité relative dans les récepteurs qui les prennent en charge, comme ont pu le décrire Crowe *et al.*,^[29] avec un temps de rétention dans la molécule CD1d et dans le TCR des iNKTs plus faible que le KRN7000, ce qui favorise préférentiellement une sécrétion d'IL-4 (cytokine sécrétée avant l'IFN- γ).

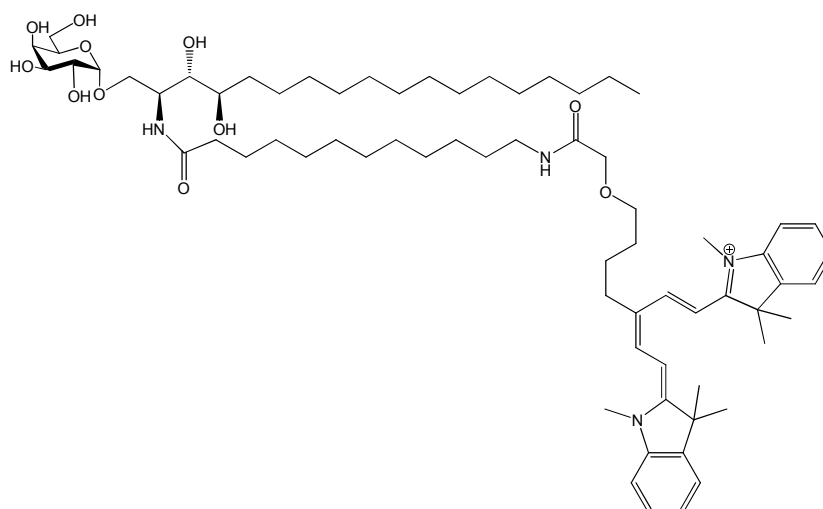
Dans tout les cas, ces résultats illustrent que les modifications apportées en position C6 n'empêchent pas une reconnaissance des différents analogues par les splénocytes.

C) Etude du rôle de différents sous-types de cellules dendritiques - Etude avec les molécules KRN-FITC et KRN-Cy5

- KRN-FITC:



- KRN-Cy5 :



Ces deux molécules ont été utilisées par le groupe du Dr. François Trottein de Lille, pour aider à identifier le rôle des DCs spléniques $CD4^-$ et $CD4^+ CD8\alpha^-$ dans l'activation des lymphocytes T de type iNKT. Lors des tests préliminaires la molécule KRN-FITC s'est montré active mais n'a pu être utilisée. En effet la longueur d'onde d'émission du FITC atteint la limite de détection de l'appareil de cytométrie de flux utilisé à Lille. La molécule KRN-Cy5 s'est montrée tout aussi efficace, mais avec une meilleure visibilité lors des tests de fluorescence, sa longueur d'onde d'émission étant compatible avec les caractéristiques de la machine de cytométrie de flux. Ci-dessous sont récapitulées les caractéristiques des deux fluorophores.

Tableau II.2 : Caractéristiques des fluorophores FITC et Cy5

	FITC	Cy5
Longueur d'onde d'excitation	494 nm	649 nm
Longueur d'onde d'émission	518 nm	670 nm
Coefficient d'extinction molaire	70 000 cm ⁻¹ M ⁻¹ à 494 nm	250 000 cm ⁻¹ M ⁻¹ à 649 nm

L'utilisation de cette molécule a débouché sur une publication du Dr. Emilie Bialecki, membre de l'équipe du Dr. Trottein.^[164] Grâce au KRN-Cy5, ils ont ainsi pu démontrer que les DCs de type CD4⁻ et CD4⁺ CD8 α ⁻ n'ont pas le même rôle dans la présentation d'une molécule glycolipidique aux cellules iNKT, dans des conditions *in vitro* et *in vivo*.

Pour démontrer cela, ils ont d'abord vérifié que les deux sous-types de DCs prennent bien charge une molécule de type α -GalCer dans des conditions *in vitro*. C'est ainsi que notre molécule KRN-Cy5 a été synthétisée et testée pour observer ces propriétés d'activation des cellules iNKTs. Comme illustré sur la figure II.5, des précurseurs de DCs issus de moelle osseuse de souris « Wild-type » (WT) ou de souris CD1d-KO, sont présentés à des doses croissantes de KRN-Cy5. Le taux de cytokine IL-2 illustre la production des hybridomes d'iNKT en réponse à l'expression du CD1d par les DCs. Les taux d'IFN- γ et d'IL-4 mesurés indiquent une sécrétion des iNKT primaires en réponse à la présentation du KRN-Cy5 par le CD1d des DCs. Donc ces résultats montrent bien que la réponse est CD1d dépendante car les cellules issues de souris CD1d-KO ne sécrètent rien, et que la réponse est dose-dépendante.

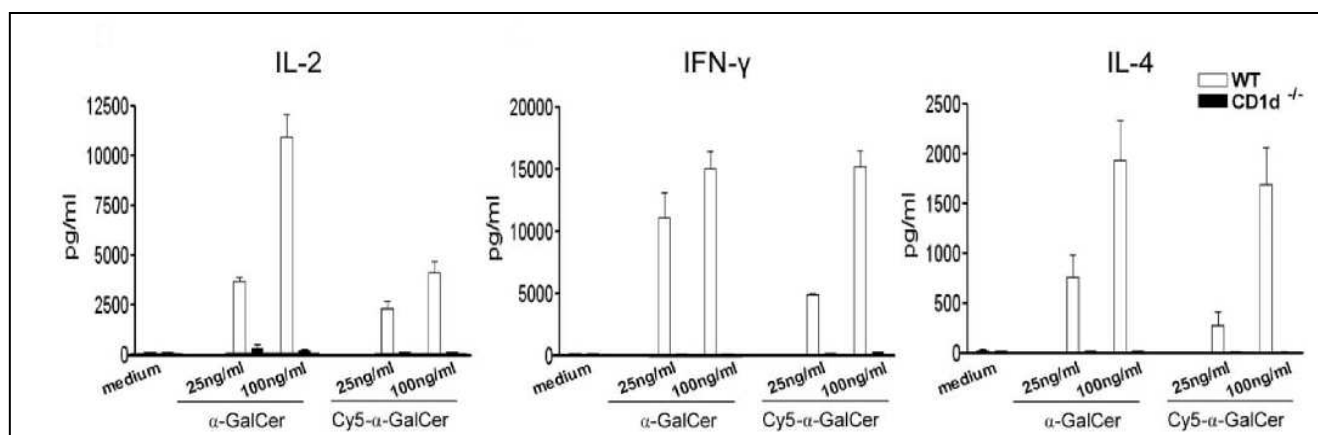


Figure II.5 : Taux de sécrétion de cytokines en fonction de l' α -GalCer KRN7000 ou du KRN-Cy5 (Cy5- α -GalCer). Les cytokines IL-2, IFN- γ et IL-4 sont mesurées en fonction de deux concentrations de KRN7000 et KRN-Cy5 différentes, 25 ng/ml et 100ng/ml.

Ils ont ensuite comparé *in vivo* le taux d'incorporation d' α -GalCer dans les deux sous-unités de DCs testées. La figure II.6 nous montre que 2h après l'administration de KRN-Cy5, les sous-types de DCs $CD4^+$ et $CD4^-$, sont bien liés à notre molécule et ce dans des proportions équivalentes.

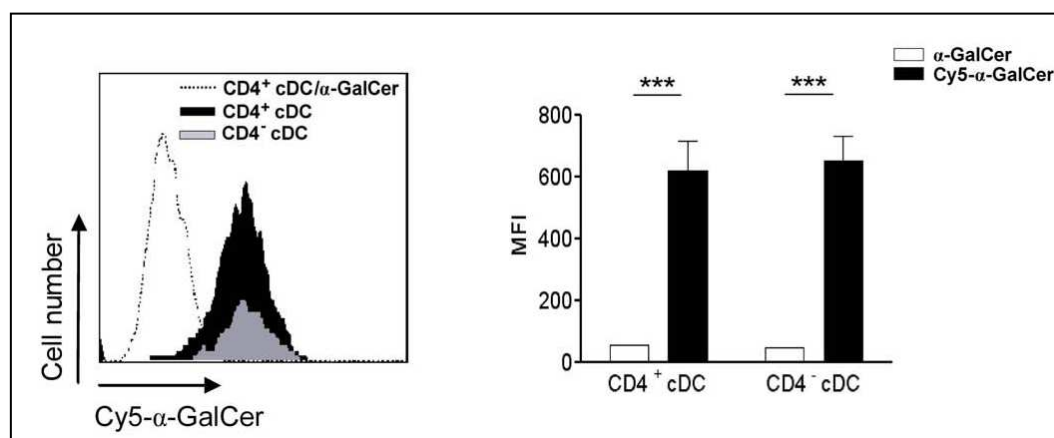


Figure II.6 : Analyse par cytométrie de flux de la prise en charge du KRN-Cy5 (Cy5- α -GalCer) par les cellules dendritiques $CD4^+$ et $CD4^-$. Le KRN7000 (α -GalCer) sert de contrôle dans les deux exemples illustrés. Sur le schéma de gauche, le nombre de cellules incorporant du KRN-Cy5 est identique pour les deux sous-types de DCs, les cellules $CD4^+$ cDC/ α -GalCer (ligne en pointillé) étant le contrôle. Pour une meilleure lisibilité, l'intensité des cellules DCs $CD4^-$ en gris ($CD4^-$ cDC) a été réduite. Le graphique de droite illustre l'intensité de fluorescence du KRN-Cy5, identique chez les DCs $CD4^+$ et $CD4^-$.

D) Conclusion

La molécule KRN-Cy5 a été utilisée dans le but de prouver le rôle de deux sous-types de DCs. Cette molécule a pu être utilisée pour mener des tests biologiques conduisant à la publication de Bialecki *et al.*^[164]. Il a été ainsi montré que le sous-type $CD4^+$ de DC, ne permettait pas de présenter le ligand aux cellules iNKTs à l'inverse du sous-type $CD4^-$.

Pour nos analogues KRN-Phe, les résultats obtenus sont plus mitigés. Le profil pro-Th1 recherché n'est pas apparu comme nous l'espérions et c'est plutôt le profil pro-Th2 qui ressort de ces premiers tests. Ce profil pro-Th2 n'a pas d'incidence sur la réponse anti-tumorale, mais il peut aussi être intéressant, comme dans le cas de maladies auto-immunes (ex : diabète de type 1, lupus, uvéite) apparaissant notamment à cause d'une réponse Th1 non régulé.

Ainsi, l'idée de combiner deux éléments permettant d'obtenir une réponse pro-Th1 n'est pas forcément la clé pour obtenir une meilleure réponse de ce type. Il s'avère même que nos molécules les « plus » pro-Th1 (KRN-Phe-NH₂ et KRN-Phe-Boc), sont celles qui n'ont qu'une fonction reconnue comme étant activatrice de réponse Th1 (à savoir le groupement phényle sur la céramide). Le KRN-Phe-Naph (qui regroupe les idées de Trappeniers *et al.*^[89]

et de Fujio *et al.*^[112]) se montre être loin de nos attentes dans ces tests préliminaires, puisque les réponses observées avec cette molécule n'ont pas montré de profil pro-Th1.

Le KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ à montrer des résultats similaires à ceux observés par Ebensen *et al.* avec leurs analogues pégylés,^[86] c'est-à-dire que ces analogues fournissent une réponse plutôt pro-Th2. Mais ce composé a été synthétisé dans le but de pouvoir le dissoudre dans un milieu physiologique. Nos tests utilisant des concentrations molaires, ont permis de montrer que l'utilisation de tampon physiologique permet une sécrétion de cytokine, avec des taux comparables aux taux observés avec du DMSO. Ceci est très important dans le cadre d'une administration *in vivo*, car cela permet d'une part d'éviter les effets toxiques du DMSO, et d'autre part cela permet d'éviter l'utilisation d'un transporteur pour solubiliser la molécule dans un milieu physiologique.

Il reste maintenant à voir le comportement de nos analogues dans un modèle *in vivo* pour confirmer ou non le profil pro-Th2 de nos molécules.

CHAPITRE III :

Vectorisation de l' α -GalCer, KRN70000

I) Introduction

Dans ce chapitre nous présentons la vectorisation de l' α -GalCer KRN7000. L'objectif étant d'optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale, en insérant le KRN7000 dans des vecteurs, dont la surface va être modifiée afin d'améliorer la disponibilité du ligand vers sa cible. Cette cible est la cellule dendritique, qui possède la molécule CD1d à sa surface, reconnaissant le KRN7000.

Le KRN7000 est vectorisé dans des liposomes de type SUV (Small Unilamellar Vesicle) conjointement à une molécule permettant d'augmenter sa biodisponibilité. On insère pour cela un phospholipide fonctionnalisé par un PEG₂₀₀₀ dans la bicouche du vecteur. Cette fonction hydrophile limite l'opsonisation et permet une augmentation du temps de demi-vie des particules recouvertes dans l'organisme. Nous modifions aussi la taille du liposome en l'augmentant pour obtenir des particules de taille supérieure à 200 nm, limite au-delà de laquelle les lymphocytes B ne prennent plus en charge ces particules, ce qui devrait favoriser leur capture par les DCs.^[63] Nous formulons pour cela des liposomes REV qui sont des liposomes ayant une taille supérieure à 200 nm (Reverse Evaporated Vesicle).

Le KRN7000 est vectorisé avec également des molécules permettant d'améliorer sa délivrance aux DCs. On utilise donc des molécules des molécules permettant le ciblage de récepteurs présents à la surface des DCs comme le récepteur mannose ou le récepteur CD11c. Enfin, le KRN7000 est vectorisé avec des molécules permettant la stimulation de la réponse immunitaire adaptative. Nous allons ainsi induire la maturation des DCs, car c'est une des étapes clé de la présentation du KRN7000 aux iNKTs, en utilisant pour cela des ligands des Toll-Like-Receptor 2/1 et 2/6 présents à la surface des DCs (les TLR 2/1 et 2/6 sont impliqués dans la maturation des DCs). Nous associons aussi le KRN7000 avec un peptide d'intérêt, spécifique d'un modèle tumoral, afin d'évaluer l'efficacité anti-tumorale des constructions.

Le KRN7000 est également vectorisé dans des particules de PLGA à titre de comparaison, pour évaluer l'influence de la taille de la particule sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Ceci est effectué à l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique de Lille, chez le Pr. Didier Betbeder.

II) Vectorisation et optimisation de la délivrance du KRN7000

A) Notre vecteur, le liposome

Les liposomes sont des particules constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ceux utilisés dans le cadre de mes travaux de thèse, sont de type SUV (Small Unilamellar Vesicle) et sont présentés sur la figure III.1. Ils présentent des diamètres moyens de 100 nm. Nous avons aussi utilisé des REV (Reverse Evaporated Vesicle), qui sont également des vésicules unilamellaires mais de taille plus importante (300-500 nm) et qui diffèrent par leur méthode de fabrication. Ces deux constructions liposomales sont constituées de la L- α -phosphatidylcholine de jaune d'oeuf (PC), de la L- α -phosphatidyl-DL-glycérol (PG) transestérifié à partir de PC de jaune d'œuf, ainsi que de cholestérol.

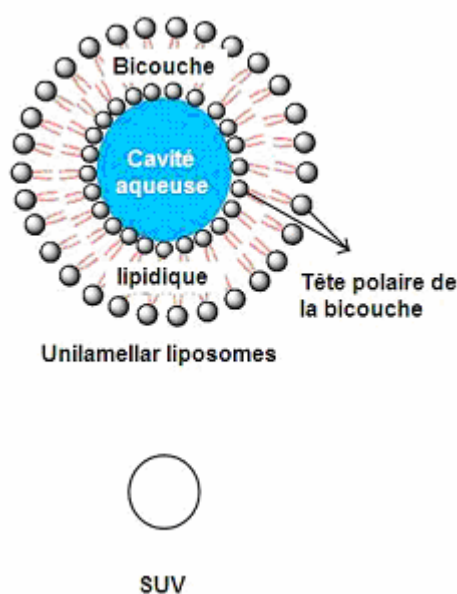


Figure III.1 : Structure schématique des liposomes SUV.

Les SUVs sont fabriqués par la méthode d'hydratation d'un film lipidique.^[165] Ce film est composé des phospholipides et du cholestérol, mais aussi des autres composés lipidiques comme le KRN7000 (figure III.2) ou des ancres fonctionnalisées par exemple. L'hydratation du film conduit à la formation de liposomes de tailles grossières, des MLVs (Multi Lamellar Vesicle). Pour obtenir les SUVs, une étape de sonication est nécessaire afin de former des liposomes unilamellaires de petites tailles uniformes.

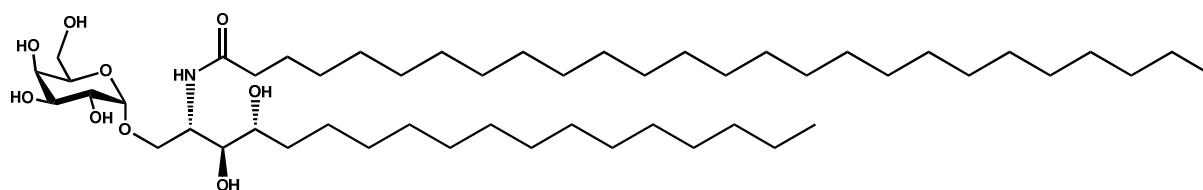


Figure III.2 : KRN7000

Les REVs ont une taille comprise entre 300 et 500 nm. Leur méthode de préparation diffère légèrement de celle des SUVs. Au début on forme également un film lipidique dans lequel on retrouve tous les éléments cités pour les SUVs. Ce film est hydraté, mais on rajoute également un solvant organique, du diéthyléther, suivant le principe de Szoka *et al.*^[166] L'évaporation contrôlée du solvant va permettre une réorganisation lente des composés lipidiques dans le milieu aqueux restant, formant de larges liposomes unilamellaires.

Il est important de noter que la nature des phospholipides est importante, du fait de leur température de transition de phase. Les phospholipides utilisés au laboratoire ont des températures de transition très basse (inférieure à 0°C) ce qui permet de travailler à température ambiante. D'autres phospholipides ont des températures beaucoup plus élevées (jusqu'à 50°C), ce qui implique un chauffage pour pouvoir former les liposomes (problématique dans le cas des REVs, notamment pour l'évaporation contrôlée de l'éther).

La présence d'une bicouche phospholipidique chez les SUVs et REVs, permet d'y insérer des molécules hydrophobes possédant des chaînes grasses. C'est ainsi que l'on peut insérer le KRN7000, ou des ancres fonctionnalisées par exemple.

B) Molécules utilisées pour optimiser la réponse immunitaire

Le KRN7000 est vectorisé dans les liposomes en même temps que d'autres composés, comme des ancres. Ces ancres possèdent des chaînes grasses (à l'instar du KRN7000), et sont intégrées au film lipidique des liposomes, au même titre que les phospholipides et le cholestérol constituant la bicouche membranaire.

1) Molécule permettant d'augmenter la biodisponibilité du KRN7000

Pour augmenter la biodisponibilité du KRN7000 dans l'organisme, nous utilisons une molécule appelée Polyéthylène Glycol ou PEG.

Les PEG sont des polymères hydrophiles inertes et biocompatibles, de tailles variables et ayant une activité dépendante de leur masse moléculaire. On note ainsi par exemple que le PEG₈₀₀₀ a montré son efficacité, dans un modèle animal, dans la prévention du cancer colorectal.^[167] Le PEG₅₀₀₀ est utilisé pour améliorer la biodisponibilité de nanoparticules d'oxyde de fer^[168] utilisées en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

Le PEG est également utilisé sur des nanoparticules, car il crée à leur surface une couche hydrophile protectrice, qui masque la charge et les zones hydrophobes en surface des particules. Cela permet d'éviter d'une part l'agrégation des nanoparticules entre elles et avec des molécules du sang, et d'autre part d'échapper à l'opsonisation et au système réticulo-endothélial en réduisant la phagocytose par les macrophages. On a donc des nanoparticules stériquement stables, dont le temps de rétention dans la circulation sanguine va augmenter.^[169]

Les premières expériences mettant en jeu des liposomes pégylés, datent du début des années 1990 avec Papahadjopoulos *et al.*, qui ont montré que les liposomes pégylés, appelé furtifs, permettent d'augmenter jusqu'à 5 fois le temps de circulation dans le sang par rapport à des liposomes classiques.^[170] Le temps de demi-vie des liposomes furtifs étant d'environ 15h, alors que celui des liposomes classiques est d'environ 30min.

Le PEG₂₀₀₀ est le plus souvent utilisé pour stabiliser les liposomes injectés dans la circulation sanguine. Dos Santos *et al.* ont récemment étudié la stabilité dans la circulation sanguine de liposomes contenant du PEG de masse moléculaire différentes.^[171] Ils ont ainsi montré que le PEG₂₀₀₀ était le plus efficace pour augmenter le temps de demi-vie plasmatique, à condition de l'utiliser à une concentration minimale de 2% molaire par rapport aux phospholipides totaux. L'insertion du PEG dans les nanoparticules comme les liposomes, se fait dans la bicouche grâce à des phospholipides fonctionnalisés, comme par exemple la DSPE-PEG (Di-Stéaroyl-Phosphatidyl-Ethanolamine) ou DPPE-PEG (Di-Palmitoyl-Phosphatidyl-Ethanolamine).

L'objectif de nos travaux est d'optimiser la délivrance du KRN7000 dans l'organisme, en augmentant la durée de vie du vecteur transportant notre ligand. C'est pourquoi nous combinerons la vectorisation du KRN7000 dans le liposome, avec un phospholipide fonctionnalisé par un PEG₂₀₀₀.

2) Molécules permettant le ciblage actif des DCs

a) Ciblage du récepteur mannose

Le ciblage des DCs se fait grâce à la molécule DOG-Man₂ qui est une ancre dimannosylée. Elle va permettre le ciblage du récepteur mannose présent à la surface des DCs. Cette ancre, illustrée sur la figure III.3, a été synthétisée au laboratoire et a montré son efficacité dans le ciblage des DCs.^[172]

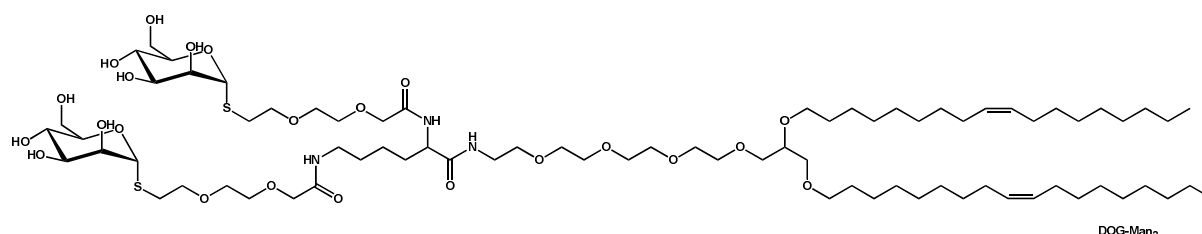


Figure III.3 : Ancre Dimannosylée.

Le récepteur mannose (MR) est aussi appelé CD206. Il fait partie du groupe IV de la superfamille des lectines de type C. Le MR possède plusieurs domaines, avec une région extracellulaire amino terminale riche en cystéines, un domaine de fibronectine de type II, huit domaines CTLD (C-type lectin-like domains) et un domaine transmembranaire avec une petite extrémité cytoplasmique. Le domaine riche en cystéines permet la reconnaissance de sucres sulfatés, les huit domaines CTLD reconnaissent des sucres avec du D-mannose, L-fucose ou N-acetyl glucosamine.^[173] Le domaine de fibronectine reconnaît les collagènes de type I, II, III et IV.^[174]

Le MR est exprimé sur les DCs, mais aussi sur les macrophages, sur les monocytes et sur les épithéliums lymphatiques et hépatiques.^[175] Les ligands du récepteur sont le plus souvent d'origine bactérienne (*Leishmania donovani*, *Streptococcus pneumonia*...) car les motifs mannosylés sont rarement présents chez les espèces eucaryotes. Le MR joue donc un grand rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire innée et est un « Pattern Recognition Receptor » (PRR).

Le MR est en permanence recyclé entre la membrane plasmique et les compartiments de l'endosome tardif, même en absence de ligand. Il est donc internalisé dans des puits de clathrine, et livré à l'endosome où le ligand sera libéré, puis le MR retourne vers la membrane plasmique.^[176] Il faut aussi prendre en considération que les ligands mannosylés peuvent aussi

être reconnus par un autre récepteur, comme SIGNR1 chez la souris, ou DC-SIGN chez l'homme, qui sont des récepteurs spécifiques des DCs chez ces organismes.

b) Ciblage du récepteur CD11c

Le ciblage des DCs se fait *via* le ciblage du récepteur CD11c qui est une protéine transmembranaire possédant deux sous-unités hétérodimériques α et β . Il fait partie de la famille des intégrines, avec une chaîne α variable. On a ainsi dans la famille des CD11, le CD11a qui possède une chaîne α de 180kD, le CD11b de 170kD et le CD11c de 150kD.^[177] Cette chaîne forme avec l'intégrine β 2 (connue aussi sous le nom de CD18) le récepteur du complément 4 (CR4).^[178] Le CD11c est majoritairement présent sur les DCs, mais on le trouve également en plus faible quantité sur les macrophages, les cellules NK ou les lymphocytes B.

Les ligands du CD11c sont multiples. On trouve la molécule du complément iC3b qui participe à l'opsonisation, les molécules d'adhésion cellulaire comme ICAM-1 et ICAM-4, les molécules composant la membrane des bactéries comme les LPS (LipoPolySaccharide) ou les protéines de la matrice cellulaire comme le fibrinogène ou le collagène.^[177, 179] Une fois le ligand reconnu, les DCs présentent l'antigène aux cellules T-CD4⁺ et T-CD8⁺ *via* les complexes du CMH-I et du CMH-II.

Une étude menée par van Broekhoven *et al.*^[180] a aussi montré que le ciblage des DCs par le CD11c était possible en utilisant des anticorps anti-CD11c, ces derniers étant vectorisés par des liposomes. Dans cette étude les anti-CD11c modifiés par une hexahistidine (H6), sont associés aux liposomes par chélation avec une ancre lipidique appelée NTA₃-DTDA (3(Nitrilotriacetic acid)-ditetradecylamine).

Dans notre cas, nous utilisons des anticorps anti-CD11c commerciaux, obtenus à partir d'IgG de rat. L'équipe du Dr. François Trottein effectue la séparation des deux fragments Fc et F(ab')₂. Afin d'obtenir les fragments Fab' anti-CD11c désirés, nous effectuons un clivage des ponts disulfures qui se situent entre les deux chaînes lourdes du F(ab')₂. On obtient donc 2 fragments Fab' possédant une fonction thiol libre, permettant de coupler le fragment d'anticorps sur le maléimide pour former le complexe de la figure III.4.

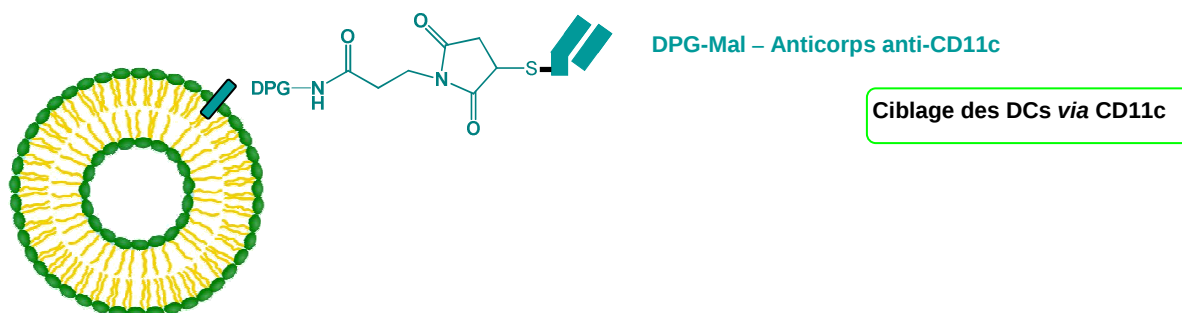


Figure III.4 : Ancre DPG-Mal fonctionnalisée par le fragment d'anticorps anti-CD11c.

3) Molécules permettant la stimulation de la réponse immunitaire adaptative

a) Ancres Pam₃CysAlaGly et Pam₂CysAlaGly - Ligands des TLRs 2/1 et 2/6

Les TLRs (Toll-Like Receptors) sont des récepteurs qui font partie de la famille des PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ils jouent un rôle dans la reconnaissance des cellules hôtes et dans la réponse aux pathogènes microbiens.^[181] Au niveau structurel, ce sont des protéines transmembranaires de type I qui comprennent un domaine extracellulaire riche en leucine, reconnaissant les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), et un domaine cytosolique appelé TIR (Toll-IL-1 receptor).

Le nombre actuel de TLRs connus est de 10 chez l'homme et 12 chez la souris. Ils sont situés pour la plupart sur la surface cellulaire, mais on en trouve aussi dans des vésicules intracellulaires.^[182] Nous savons que le TLR 2, présent sur les DCs, reconnaît une large gamme de PAMPs associés aux bactéries Gram négative et positive, comme des lipoprotéines ou des peptidoglycanes. Il forme des hétérodimères avec les TLR1 et TLR6. L'hétérodimère TLR2/TLR1 reconnaît des lipopeptides triacylés (présents sur les bactéries Gram-négative), alors que le TLR2/TLR6 reconnaît des lipopeptides diacylés (présents sur les bactéries Gram-positive).^[183] C'est pourquoi nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ces hétérodimères du TLR2.

L'objectif étant d'optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale par la stimulation de la réponse adaptative, le KRN7000 est utilisé conjointement aux Pam₃CysAlaGly (ligand du TLR2/TLR1) et Pam₂CysAlaGly (ligand du TLR2/TLR6), les deux Pam étant utilisés pour mûrer les DCs, qui est une étape clé dans la présentation du KRN7000 aux cellules iNKTs. Les deux molécules ligands des TLR2 sont présentées sur la figure III.5.

Nous possédons au laboratoire ces deux ligands (Pam₂CysAlaGly et le Pam₃CysAlaGly)^[184] que l'on associe à un liposome contenant le ligand du CD1d, le KRN7000.

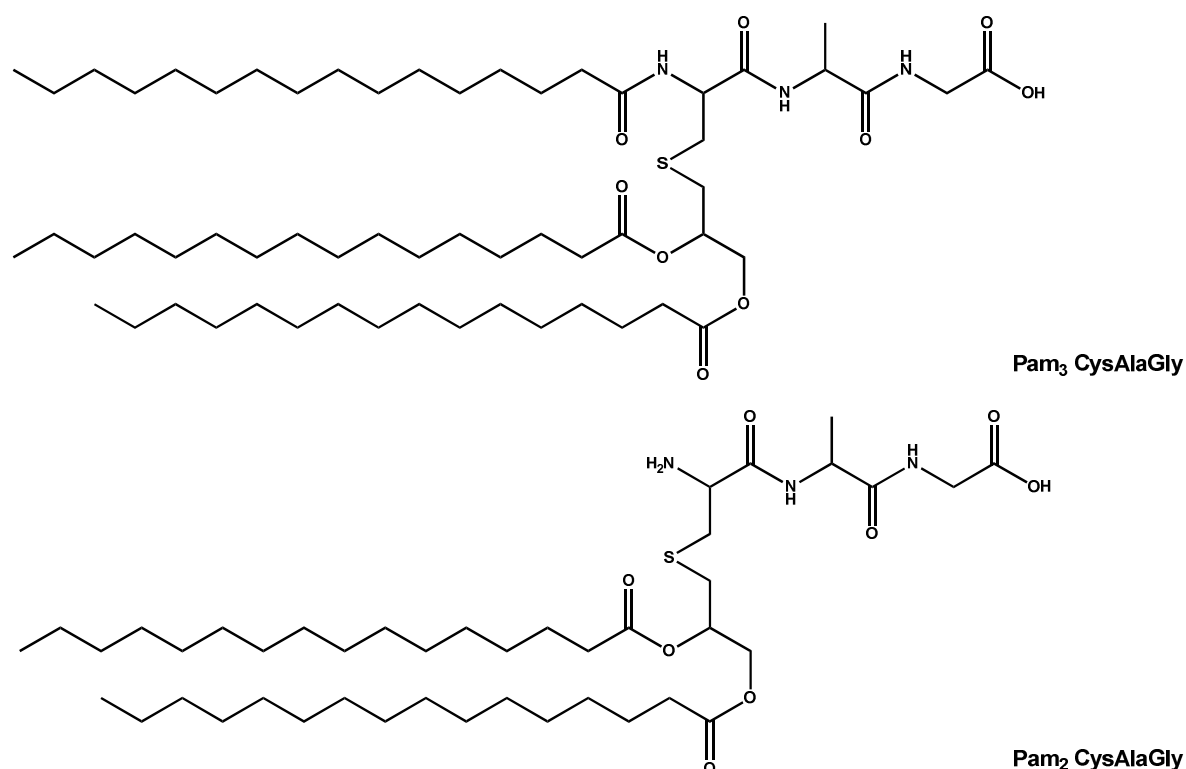


Figure III.5 : Ancres adjuvantes utilisées dans nos expériences

b) Le peptide OVA

L'objectif avec ce peptide est toujours de stimuler la réponse immunitaire adaptative dans le cadre d'un mélanome exprimant le récepteur spécifique de notre antigène qui est un analogue du peptide OVA.

Pour pouvoir associer ce peptide à des liposomes *via* l'ancre DPG-Mal (figure III.6), il a fallu le modifier. Ainsi, le peptide OVA a été fonctionnalisé par une cystéine C ou N terminale, par le Laboratoire de synthèse des peptides (IBMC – Strasbourg – UPR 9021 – Immunologie et Chimie Thérapeutique). Les séquences testées sont (SIINF^EKL-**C**) et (**C**-SIINF^EKL), et correspondent aux acides aminés 257-264 de l'ovalbumine. Cette séquence octamérique est prise en charge dans le modèle de souris OT-1 par la molécule du CMH I, H2-K^b, exprimée sur des lymphocytes T-CD8⁺ transgéniques.^[185]

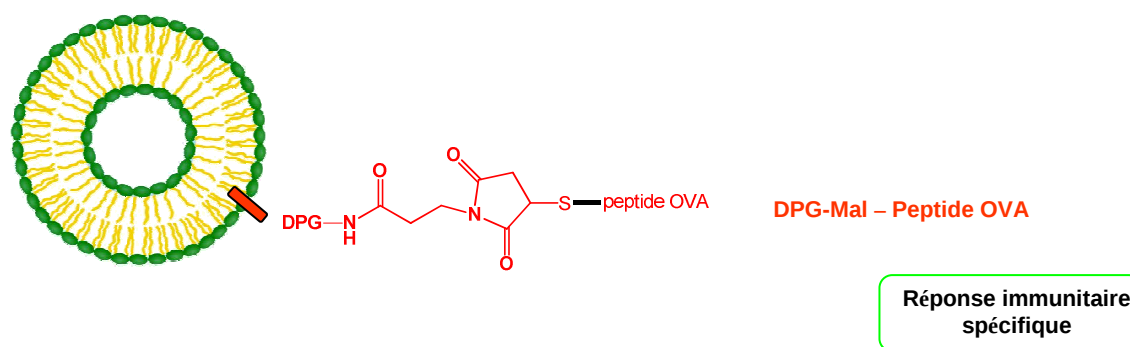


Figure III.5 : Ancre DPG-Mal fonctionnalisée par un analogue du peptide OVA.

III) Résultat et discussion de la vectorisation du KRN7000

Les formulations utilisées ici permettent de valider l'insertion du KRN7000 dans les liposomes. La quantité de KRN7000 utilisée est de 100 µg/ml de liposomes. Le tableau III.1 résume les caractéristiques principales de nos formulations.

Tableau III.1 : Caractéristiques des liposomes SUV et REV ± KRN.

	Liposomes SUV-KRN	Liposomes SUV	Liposomes REV-KRN	Liposomes REV
Concentration de KRN7000 (µg/ml)	100	/	100	/
Taille (nm)	100 ± 1	88 ± 3	337 ± 41	236 ± 25
Indice de polydispersité	0,1	0,2	0,2	0,3

Pour observer la prise en charge de nos constructions par les cellules immunitaires, deux tests ont été mis en place par l'équipe du Dr. Trottein. Dans le premier test *in vitro*, des splénocytes sont mis en contact avec nos liposomes. Après 48h, la production d'IL-4 et d'IFN-γ est mesurée (figure III.6 ; graphique A). Dans un deuxième test *in vitro*, ce sont des DCs qui sont mis en contact avec nos liposomes pendant 24h. Après cela, les DCs sont mises en contact avec des hybridomes de cellules iNKTs pendant 48h, et la production d'IL-2 est mesurée (figure III.6 ; graphique B).

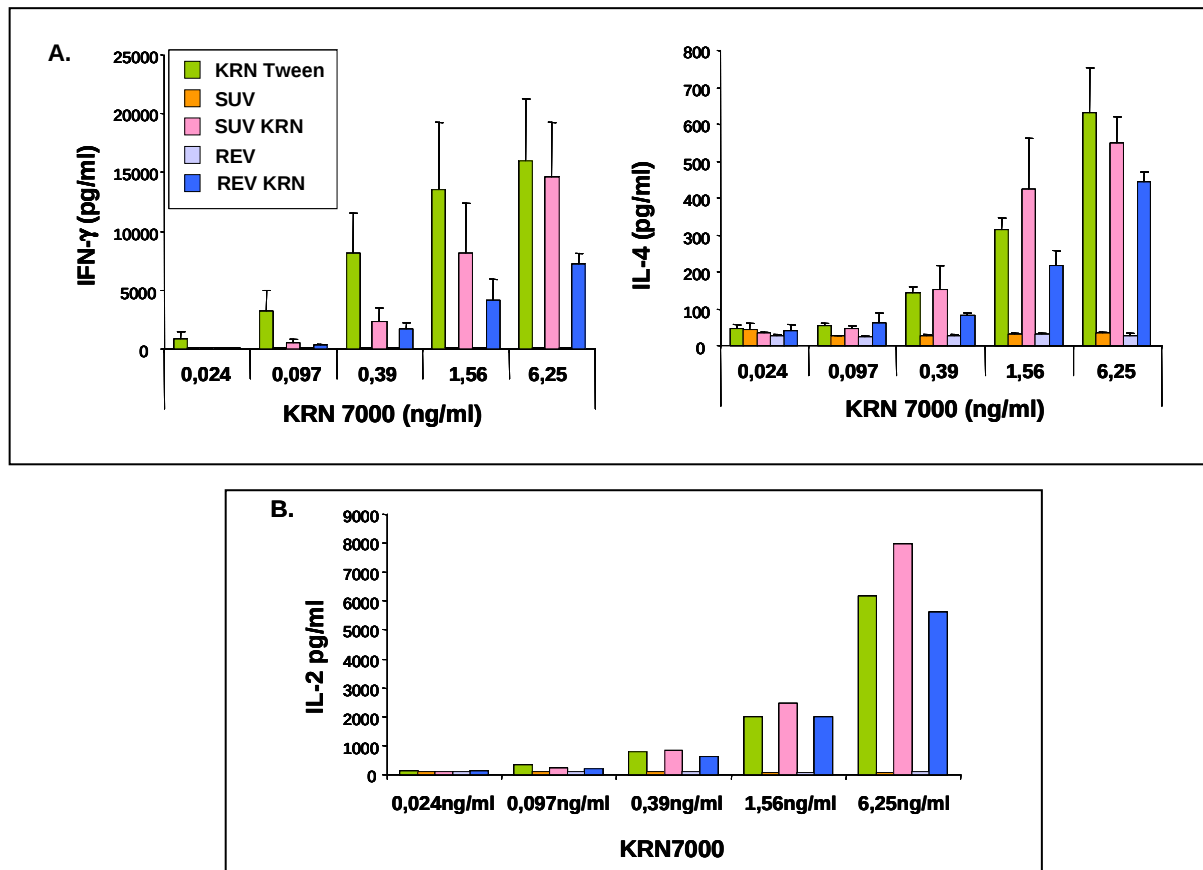


Figure III.6 : Taux de sécrétion cytokiniques induit par les liposomes SUV et REV-KRN.

Les constructions liposomiques avec du KRN (barres rose et bleu foncé) induisent une production de cytokines quasi identiques à celle induite par du KRN libre (barre verte) aussi bien dans le cas de la réponse des splénocytes (graphique A.) que dans le cas de la prise en charge par les DCs et de leur présentation aux hybridomes iNKTs (graphique B.). Les liposomes SUV (barre orange) et REV (barre bleu clair) ne provoquent pas de réponse, car ces deux populations ne contiennent pas de ligand.

Tout ceci traduit une réponse dépendant de la présence de KRN7000, quelle que soit la taille du liposome utilisé. On note aussi que les réponses sont doses dépendantes, avec une sécrétion cytokinique qui augmente lorsque la quantité de KRN7000 augmente.

IV) Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre les moyens utilisés pour vectoriser le KRN7000, et les moyens mis en œuvre pour optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale. La vectorisation passe donc par l'utilisation de liposomes (SUV et REV) formulés dans notre laboratoire. Nous avons vu que l'utilisation du liposome, que ce soit des SUV ou des REV,

permet une prise en charge du KRN7000 par les cellules immunitaires, ceci se traduisant par une sécrétion de cytokines à des taux comparables au KRN7000 libre.

Nous avons montré que l'incorporation du KRN7000 dans la bicouche des liposomes ne modifiait pas son activité. Les étapes suivantes vont consister à optimiser la construction en lui associant séparément les différents éléments présentés sur la figure III.7. L'activité anti-tumorale des liposomes encapsulant ces composants est présentée dans le chapitre IV suivant.

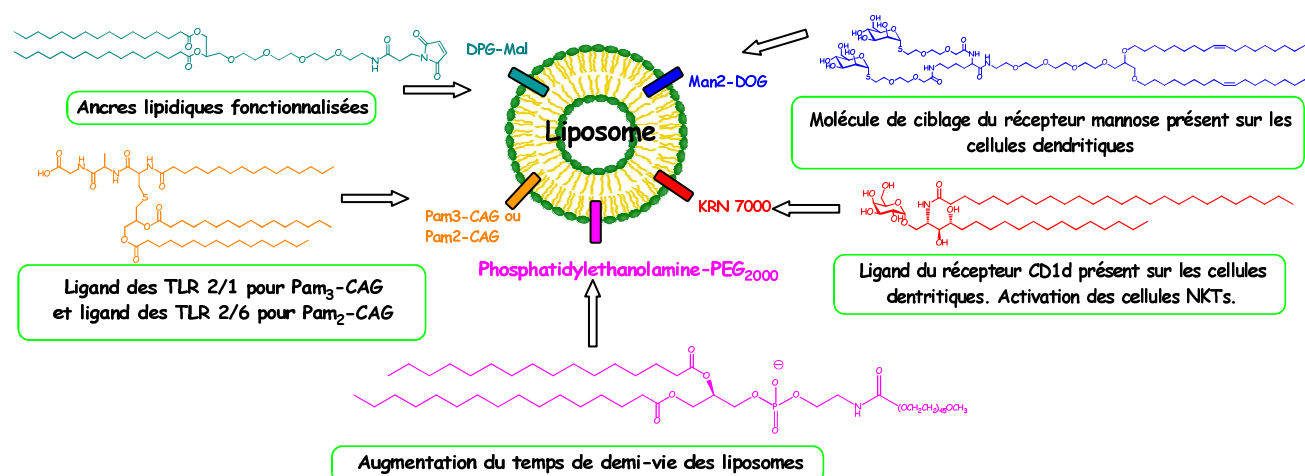


Figure III.7 : Illustration des éléments vectorisés dans la bicouche membranaire du liposome.

CHAPITRE IV :
Réponse anti-tumorale des constructions
liposomiques

I) Introduction

Dans ce chapitre nous traitons de l'optimisation de la réponse immunitaire anti-tumorale par nos constructions liposomiques. Ces constructions contiennent du KRN7000, mais également des éléments permettant le ciblage de récepteurs des DCs, des éléments de furtivité, ou bien des éléments permettant d'orienter la réponse immunitaire contre un modèle tumoral précis.

Nous allons donc observer l'activité de nos différentes constructions liposomiques sur la réponse immunitaire anti-tumorale, avec des liposomes associant le KRN7000 à :

- un phospholipide fonctionnalisé par un PEG₂₀₀₀ pour augmenter le temps de demi-vie du liposome dans l'organisme
- une ancre dimannose pour cibler le récepteur mannose des DCs
- une ancre DPG-Mal sur laquelle est greffée un fragment d'anticorps anti CD11c pour cibler le récepteur CD11c des DCs
- les molécules Pam₂CysAlaGly et Pam₃CysAlaGly, ligands respectivement des TLR 2/6 et 2/1 présents sur les DCs et jouant un rôle dans la maturation de celles-ci
- une ancre DPG-Mal sur laquelle est greffé un analogue de peptide OVA (ciblant le récepteur OVA présent dans le cadre d'un mélanome)

Nous traitons également dans ce chapitre un deuxième volet, à savoir l'utilisation de nos liposomes dans le cadre de la levée de l'anergie. Des tests *in vivo* sont mis en place pour vérifier l'influence du ciblage des DCs sur ce phénomène.

Dans ce chapitre, les résultats biologiques sont issus de tests effectués au sein du laboratoire du Dr. François Trottein de l'Institut Pasteur de Lille.

II) Résultats et discussions de l'optimisation de la réponse anti-tumorale

A) Préambule

Lors des tests biologiques *in vivo*, deux modèles différents de souris ont été utilisés. Tout d'abord au laboratoire du Dr. Trottein de Lille, le modèle WT (« Wild Type ») C57BL/6 est utilisé pour la plupart des tests *in vivo* mais aussi *in vitro* (prélèvement de la rate, utilisation des DCs et des cellules mononuclées). Pour les tests mettant en jeu l'analogue du peptide OVA, ce sont des souris OT-1 qui sont utilisées, exprimant le récepteur OVA dans un modèle de mélanome.

Les deux tests *in vitro* réalisés permettent dans le premier cas de mesurer la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4 grâce à l'activation de splénocytes ou des cellules mononucléées de foie, et dans le deuxième cas de mesurer la sécrétion d'IL-2 par des hybridomes de cellules iNKT (ces cellules présentent uniquement le TCR à leur surface), activées au préalable par des précurseurs de DCs (présentant uniquement le CD1d). Ce dernier test permet ainsi de confirmer que les KRN7000 est bien pris en charge et présenté de manière CD1d et TCR dépendante.

Lors des tests *in vivo*, la sécrétion cytokinique est mesurée par le dosage des cytokines dans le sérum de l'animal.

B) Influence du PEG₂₀₀₀ sur la réponse immunitaire

Le KRN est inséré dans la bicouche des liposomes SUV et REV à une concentration de 116 $\mu\text{mole/ml}$ (100 $\mu\text{g/ml}$). On insère donc dans la bicouche du liposome de la DPPE-PEG₂₀₀₀ (Di-Palmitoyl-Phosphatidyl-Ethanolamine-PEG₂₀₀₀) à une concentration de 0,05 $\mu\text{mole/ml}$. Le tableau II.3 résume les caractéristiques principales de nos formulations.

Tableau IV.1: Caractérisation des liposomes SUV et REV-KRN-PEG₂₀₀₀.

	Liposomes SUV-KRN	Liposomes SUV-KRN- PEG ₂₀₀₀	Liposomes REV-KRN	Liposomes REV-KRN- PEG ₂₀₀₀
Concentration de KRN7000 ($\mu\text{mole/ml}$)	0,116	0,116	0,116	0,116
Concentration de DPPE- PEG ($\mu\text{mole/ml}$)	/	0,05	/	0,05
Taille (nm)	85 $\pm$ 4	107 $\pm$ 3	355 $\pm$ 29	435 $\pm$ 25
Indice de polydispersité	0,1	0,1	0,3	0,3

Un premier test *in vitro* étudie la prise en charge de nos liposomes par des splénocytes issus de souris C57BL/6. Ces deux entités sont incubées pendant 48h, puis on mesure la production d'IFN- γ (graphique A.). Dans un deuxième test *in vitro*, les liposomes sont incubés avec des précurseurs de DCs pendant 24h. Après cela, les DCs sont incubées avec des

hybridomes de cellules iNKTs pendant 48h, puis on mesure la production d'IL-2 (graphique B.). La figure IV.1 illustre ces données.

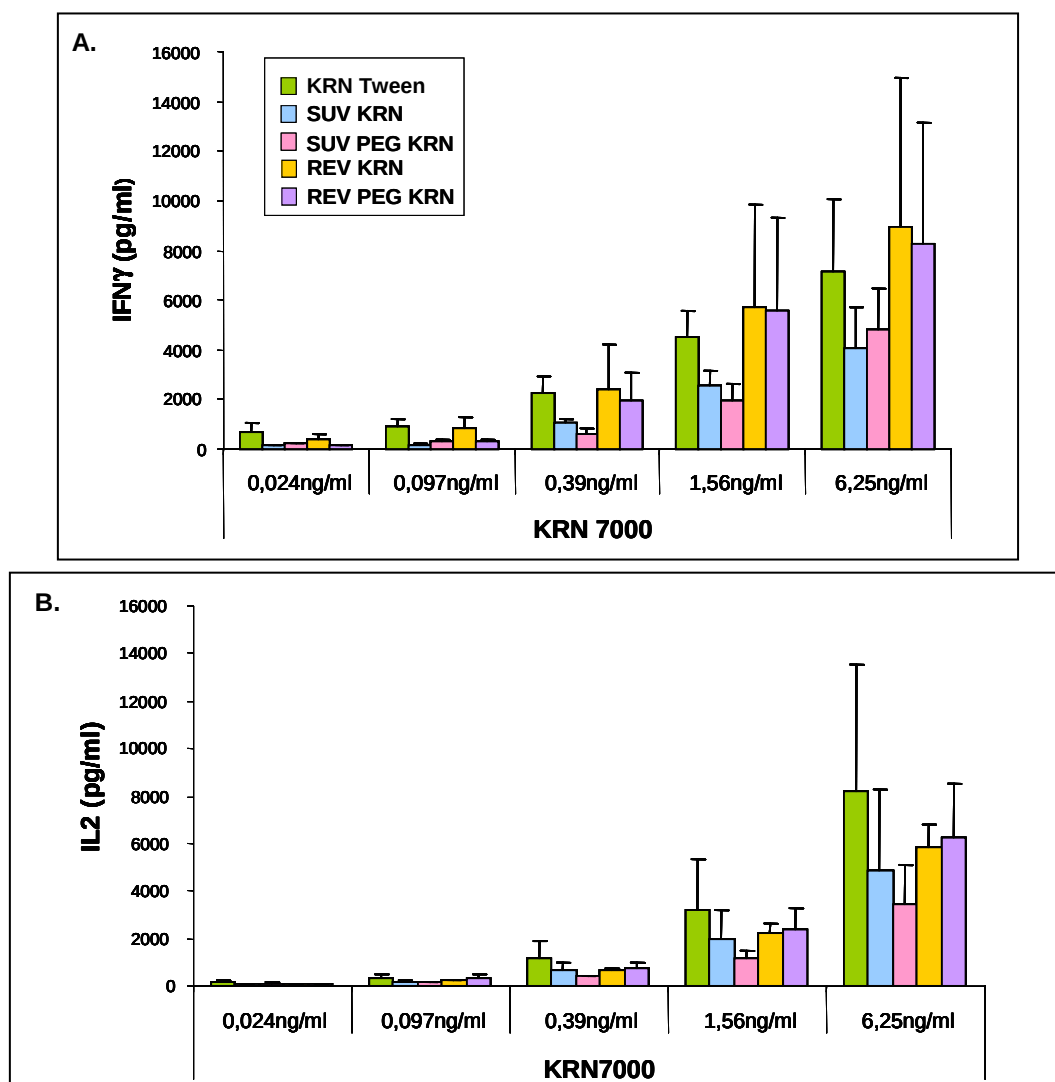


Figure IV.1 : Taux de sécrétions cytokiniques induit par les liposomes SUV et REV KRN $\pm$ PEG₂₀₀₀.

Les résultats *in vitro* de la figure IV.1 nous montre que l'insertion du PEG dans le liposome n'empêche pas la reconnaissance du ligand par les différentes cellules testées, et ce quelle que soit la taille du liposome utilisé. Ainsi les liposomes contenant du KRN7000 +/- PEG₂₀₀₀ induisent une production de cytokines quasi identique au KRN7000 Tween (KRN libre) dans le cas des REVs, et une production un peu plus faible dans le cas des SUVs. L'insertion du PEG₂₀₀₀ n'a pas donc pas d'influence sur la production des cytokines.

Ces formulations ont été testées dans un modèle *in vivo* en contrôlant la sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-4 (Figure IV.2). Pour cela, des souris ont reçu par voie intra-veineuse 100 ng de KRN7000, formulés dans différents lots de liposomes (SUV-KRN, SUV-KRN-

PEG₂₀₀₀ et REV-KRN, REV-KRN-PEG₂₀₀₀), ainsi que du KRN libre comme témoin positif. Afin de voir si le KRN vectorisé active bien le système immunitaire, le sérum est prélevé à des temps de 4h, 18h et 24h. Ceci permet de faire une cinétique de la sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-4 dans l'organisme.

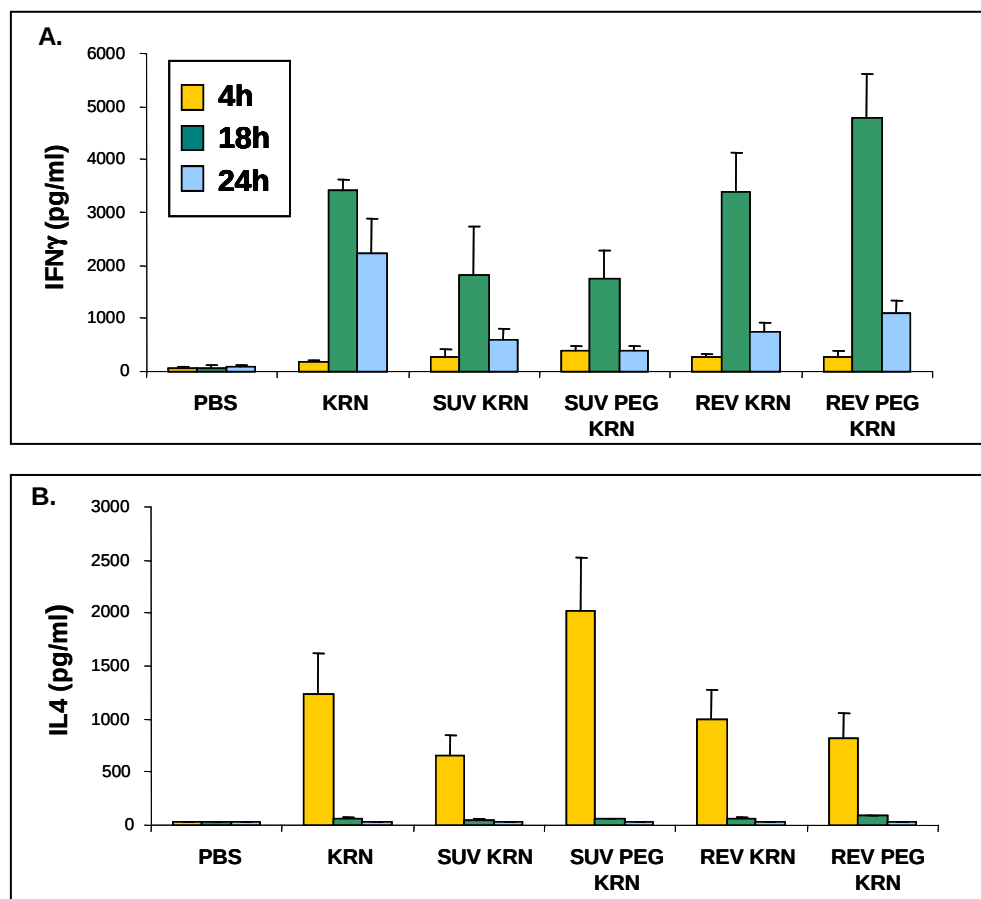


Figure IV.2 : Sécrétion cytokinique induite *in vivo*, en fonction du temps, après injection de 100ng de KRN.

Dans un premier temps on constate sur la figure IV.2 que l'IL-4 (graphique B.) est sécrétée assez rapidement après la stimulation et que le taux est quasi nul à 18h. Pour l'IFN- γ (graphique A.), la réponse est inversée avec un taux quasi nul dans les premières heures de la stimulation, puis un pic apparaît à 18h avant de redescendre à des taux plus faibles à 24h. L'étude cinétique *in vivo* visait à mettre en évidence le rôle furtif du PEG. Dos Santos *et al.*^[186] ont montré comme d'autres, que le PEG₂₀₀₀ a une influence sur le temps de demi-vie des particules dans l'organisme. Ils ont ainsi montré que lorsque les particules nues sont administrées, la concentration plasmatique en lipide liposomique chute rapidement à des taux proches de 0 μ mole/ml. Les liposomes ayant du PEG ont un taux qui chute également, mais de façon beaucoup moins brutale, et l'on retrouve au bout de 24h encore 1,25 μ mole/ml de

lipide liposomique sur les 3,5 $\mu\text{mole/ml}$ injecté au début. Cela permet au ligand d'être présent plus longtemps dans l'organisme. Dans nos travaux, la présence de PEG n'a pas d'influence sur la sécrétion des cytokines. On note néanmoins que les formulations avec PEG sont également reconnues *in vivo* et provoquent la sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-4. Ces résultats sont à relier à ceux de Bendelac *et al.*,^[187] qui avaient démontré que l'IL-4 est produite en quantité massive entre 2 et 4h après la stimulation *in vivo* et que vers 6h ce taux commençait à diminuer. Dans la même étude, les quantités d'IFN- γ commencent à augmenter vers 6h avec un pic vers 16-18h qui persiste jusqu'à 24h.

Pour conclure on peut dire que nos populations ayant un PEG sont bien pris en charge par les cellules immunitaires, aussi bien *in vitro* qu' *in vivo*. Mais nous n'avons pas observé d'amélioration significative de la réponse immunitaire en utilisant les liposomes PEG par rapport aux liposomes non PEG. Les taux de sécrétions d'IFN- γ sont plus élevés lors de l'administration de REVs par rapport aux SUVs, alors que pour l'IL-4, les taux sont similaires. Néanmoins, on ne constate pas d'amélioration de la réponse par rapport au KRN7000 libre.

C) Influence de la molécule DOG-Dimannose sur la réponse immunitaire

Les liposomes SUV utilisés encapsulent le KRN à une concentration de 0,116 $\mu\text{mole/ml}$ (100 $\mu\text{g/ml}$) et le Dimannose à une concentration de 0,3 $\mu\text{mole/ml}$ sous la forme d'une ancre appelée DOG-Man2 (Di-Oleyl-Glycerol-DiMannose).

Les caractéristiques physicochimiques des liposomes sont résumées dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Caractéristiques des liposomes SUV $\pm$ KRN et $\pm$ DiMannose

	Liposomes SUV-KRN	Liposomes SUV	Liposomes SUV-KRN-DiMannose	Liposomes SUV-DiMannose
Concentration de KRN7000 (μmole/ml)	0,116	/	0,116	/
Concentration en DiMannose (μmole/ml)	/	/	0,03	0,03
Taille (nm)	100 $\pm$ 6	84 $\pm$ 9	92 $\pm$ 3	111 $\pm$ 3
Indice de polydispersité	0,2	0,2	0,1	0,1

Deux tests *in vitro* sont mis en place (Figure IV.3). Le premier évalue la prise en charge du KRN7000 (présenté par les liposomes) par les cellules mononuclées hépatiques (barre jaune pour les SUV-KRN ; barre verte pour les SUV-KRN-DiMannose). Ceci traduit une sécrétion d'IFN- γ (graphique A.). Le deuxième test évalue par un dosage d'IL-2, la prise en charge du KRN vectorisé par les DCs et sa présentation aux hybridomes des cellules iNKTs (graphique B.).

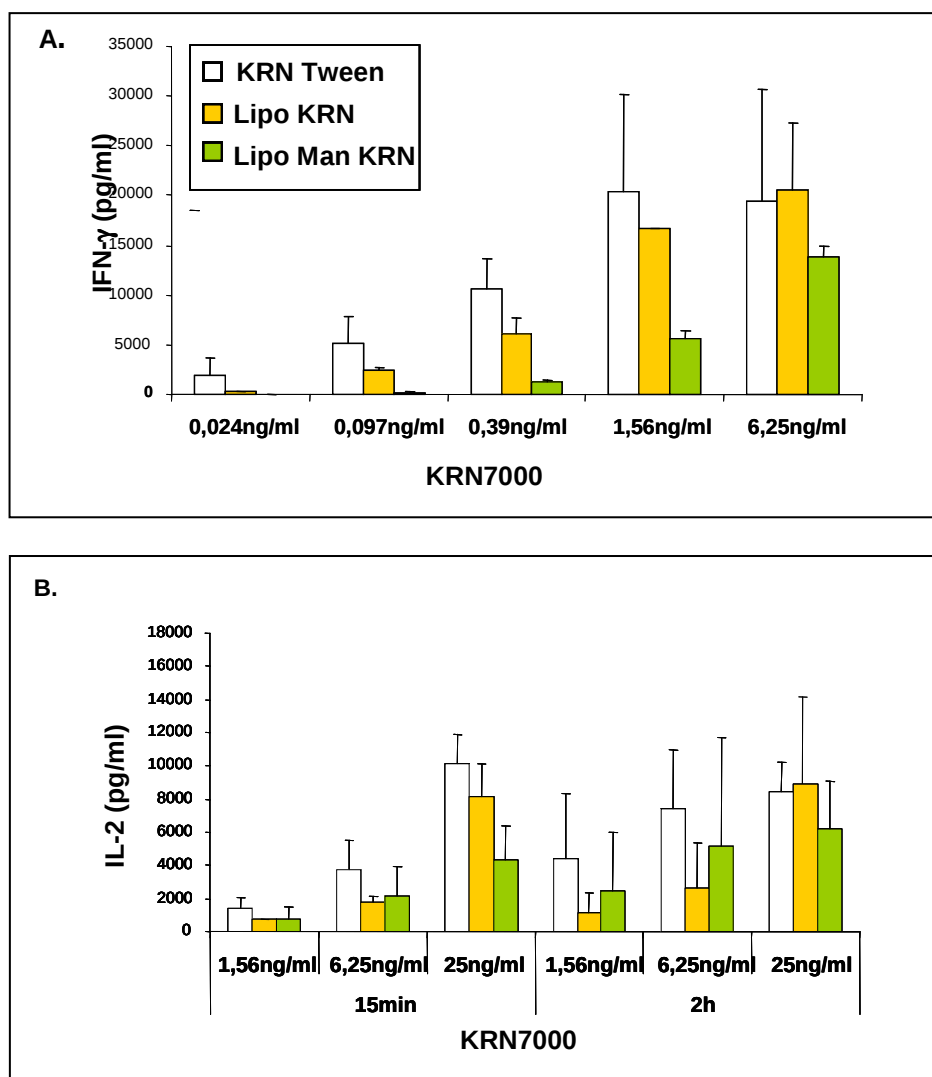


Figure IV.3 : Taux de sécrétion cytokinique induit par les liposomes KRN $\pm$ DiMannose. A. Sécrétion d'IFN- γ par les cellules mononucléées de foie. B. Sécrétion d'IL-2 par les hybridomes d'iNKTs. La durée indiquée en B. exprime le temps de contact entre les cellules dendritiques et le KRN libre ou les formulations, après quoi les DCs sont mises en co-culture avec les cellules iNKTs pendant 48h.

La figure IV.3 indique que d'une part les productions d'IFN- γ et d'IL-2 sont doses dépendantes, et d'autre part que nos constructions KRN $\pm$ DiMannose sont prises en charge aussi bien par les cellules mononuclées hépatiques que par les DCs. Le temps de contact entre les DCs et les formulations ou le KRN libre ne semble pas avoir une grande importance sur la réponse des hybridomes iNKTs, les taux de cytokines IL-2 étant assez proches pour nos différents lots. Donc la présence de DiMannose ne perturbe ni la prise en charge de nos constructions, ni la délivrance du KRN7000.

In vivo l'intérêt du ciblage par le récepteur mannose a déjà été observé. En effet, Thomann *et al.*^[188] ont montré l'efficacité thérapeutique sur certaines tumeurs de formulations liposomiques incorporant du Dimannose dans la membrane.

Pour conclure, la reconnaissance du KRN7000 est possible en présence de DiMannose dans le liposome. Pour observer l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale, il reste à observer la réponse immunitaire de nos constructions dans un modèle *in vivo*.

D) Influence du ciblage du récepteur CD11c des DCs

Les liposomes utilisés sont des SUV encapsulant le KRN7000 à une concentration de 1,16 nmoles/ml (1µg/ml). Dans cette formulation deux fragments d'anticorps différents sont utilisés. L'un est spécifique du récepteur CD11c, l'autre est non spécifique de récepteurs présents sur les DCs.

Les fragments utilisés sont des Fab', contenant des fonctions thiols libres. Pour les obtenir, l'équipe du Dr. Trottein utilise des immunoglobulines de type IgG, qui subissent une coupure enzymatique par la pepsine, pour obtenir des fragments Fc et F(ab')₂. Les fragments F(ab')₂ sont isolés et récupérés.

Nous avons ensuite clivé les ponts disulfures présents des fragments F(ab')₂ par de la mercaptoéthanolamine. Nous avons ainsi obtenu les fragments Fab' qui présentent une fonction thiol libre. Tout ceci est présenté sur le schéma IV.1.

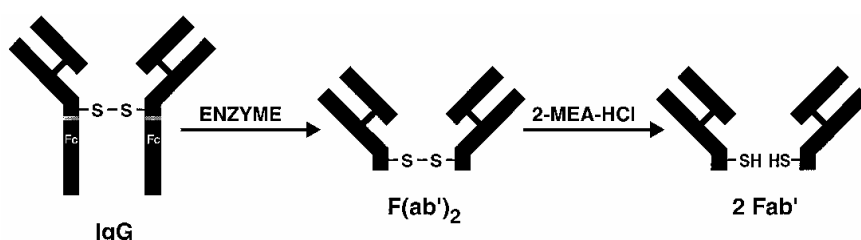


Schéma IV.1 : Obtention des fragments Fab' (d'après Dufresne et al.)^[189]

Ces fragments Fab' sont greffés à pH 6,5 *via* la fonction thiol libre, sur une ancre fonctionnalisée DPG-Maléimide insérée dans la membrane du liposome. Le schéma IV.2 illustre ce couplage :

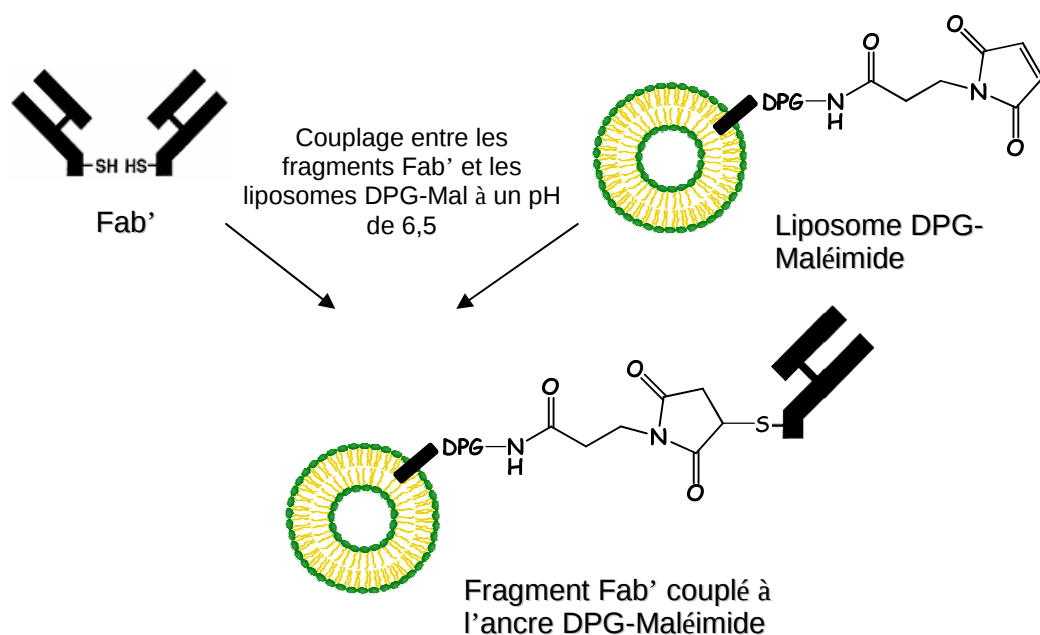


Schéma IV.2 : Couplage des fragments Fab' sur les ancres DPG-Mal insérées dans les liposomes.

La concentration de DPG-Mal dans le liposome est de 0,5 $\mu\text{moles/ml}$. Les fragments d'anticorps sont utilisés à deux concentrations différentes, comme résumé dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Caractéristiques des liposomes SUV-KRN $\pm$ Anticorps.

	Liposomes SUV-KRN	Liposomes SUV-KRN IgG 1 (10 $\mu\text{g/ml}$)	Liposomes SUV-KRN IgG 2 (40 $\mu\text{g/ml}$)	Liposomes SUV-KRN CD11c 1 (10 $\mu\text{g/ml}$)	Liposomes SUV-KRN CD11c 2 (40 $\mu\text{g/ml}$)
Concentration de KRN7000 (nmoles/ml)	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16
Taux de greffage des fragments Fab'	/	88%	99%	64%	85%
Taille (nm)	53 $\pm$ 1	70 $\pm$ 1	68 $\pm$ 1	108 $\pm$ 4	108 $\pm$ 10
Indice de polydispersité	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Lors du test *in vitro* nous vérifions que la fixation du fragment d'anticorps anti-CD11c n'entravait pas la présentation du KRN7000 aux cellules iNKTs. Pour cela deux tests sont mis en place (figure IV.4). Le premier vérifie si les splénocytes prennent en charge le KRN7000 issu de nos constructions (graphique A.). Le deuxième vérifie si les DCs prennent en charge le KRN7000 vectorisé et le présente aux hybridomes des cellules iNKTs (graphique B.). L'axe des abscisses représente les différentes concentrations de KRN7000 utilisées.

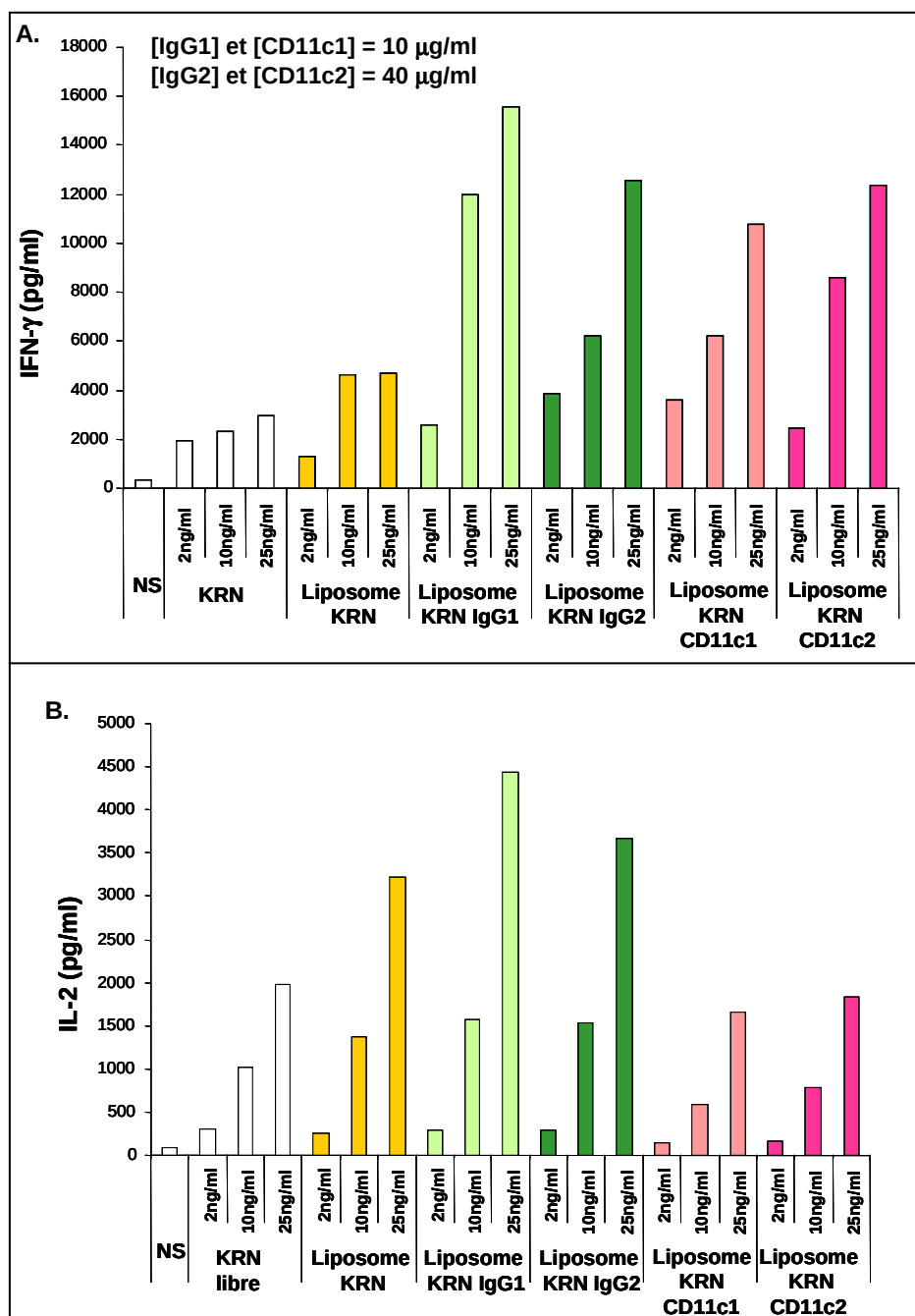


Figure IV.4 : Taux de sécrétion cytokinique induit par les liposomes KRN ± Anticorps, en fonction de la concentration en KRN. A. Le graphique illustre la sécrétion d'IFN-γ induite par les splénocytes. B. Le graphique illustre la sécrétion d'IL-2 par les hybridomes NKTs en réponse à la présentation du ligand par les DCs.

On observe sur la figure IV.4 une activité dose-dépendante pour nos différentes constructions en fonction de la concentration du KRN7000, mais la concentration de fragments Fab' utilisée (10 ou 40 µg/ml) n'a aucune incidence sur la réponse cytokinique.

Les taux de sécrétions sont assez élevés pour les liposomes KRN IgG 1 (barres vertes claires) et IgG 2 (barres vertes foncées) par rapport au KRN libre (barres blanches), alors que pour les liposomes KRN CD11c 1 (barres roses claires) et CD11c 2 (barres fuchsia) on note une réponse égale au KRN7000 dans le cas de l'IL-2, et jusqu'à 6 fois plus importante dans le cas de l'IFN-γ.

La réponse supérieure induite par les liposomes IgG, donc non spécifique, pourrait s'expliquer par la présence éventuelle d'une impureté dans le milieu.

Il serait intéressant de tester ces formulations dans un milieu *in vivo* car, comme ont pu le montrer Van Broekhoven *et al.*^[190], l'utilisation *in vivo* de formulations liposomiques dirigées contre un modèle tumoral, et encapsulant des fragments d'anticorps dirigés contre des récepteurs de DCs (CD11c et DEC205 dans leur cas), permettaient de baisser le nombre de tumeurs pulmonaires.

En conclusion, nos constructions liposomiques recouvertes de fragments d'anticorps, permettent une reconnaissance du KRN7000 de manière dose dépendante. Il serait donc intéressant de tester ces constructions dans un modèle *in vivo*.

E) Influence des ligands des TLRs en présence du KRN7000 sur la réponse immunitaire

Dans des liposomes de type SUV, le KRN7000 est encapsulé dans la bicouche à une concentration de 1 µg/ml. Les adjuvants des TLR (Pam₂CysAlaGly et Pam₃CysAlaGly) sont également associés, à une concentration de 20 µg/ml pour le Pam₂CysAlaGly et 200 µg/ml pour le Pam₃CysAlaGly. Le tableau IV.4 résume les caractéristiques des formulations.

Tableau IV.4 : caractéristiques des liposomes SUV-KRN, SUV KRN-Pam₂ et SUV KRN-Pam₃.

	Liposomes SUV KRN	Liposomes SUV KRN- Pam₂CysAlaGly	Liposomes SUV KRN- Pam₃CysAlaGly
Concentration de KRN7000 (µg/ml)	1	1	1
Concentration en adjuvant (µg/ml)	/	20	200
Taille (nm)	61 ± 2	75 ± 5	62 ± 1
Indice de polydispersité	0,2	0,2	0,1

Ces populations sont testées dans un modèle *in vitro* afin de vérifier l'influence des adjuvants sur l'activation des DCs. Pour cela nos différentes populations sont mises en contact avec des DCs pendant 1 nuit, puis le taux d'IL-6 est mesuré (l'interleukine 6 est spécifique de l'activation des DCs). Le contrôle positif est représenté par la molécule CpG qui est un oligodeoxynucléotide, ligand du TLR9,^[191] ainsi que par la molécule Pam qui est en fait du Pam₃CSK₄, ligand du TLR 2/1.^[183]

Nos constructions liposomiques SUV KRN-Pam₂CAG et SUV KRN-Pam₃CAG sont testées sur des cellules CD1d KO pour mettre en évidence l'influence des adjuvants. Les liposomes KRN7000 confirment que les cellules sont bien KO pour le CD1d. Tout ceci est présenté sur la figure IV.5.

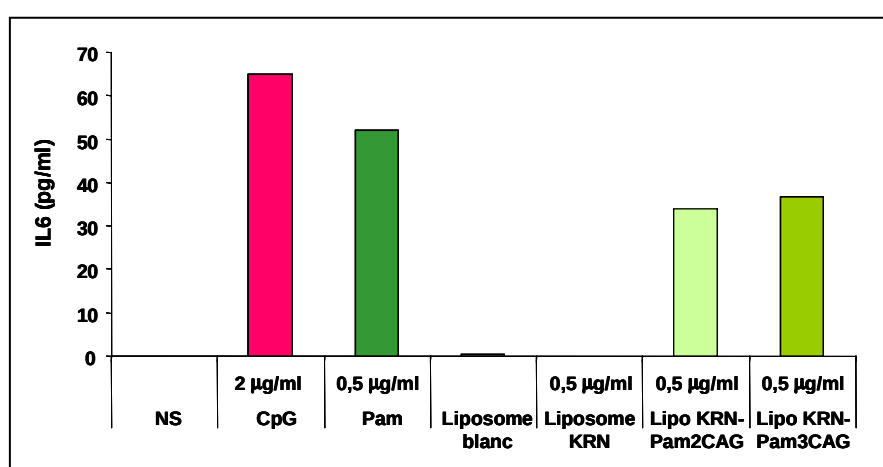


Figure IV.5 : Sécrétion d'IL-6 après activation des cellules dendritiques.

Sur la figure IV.5 on constate que nos formulations sont prises en charge par les DCs, car celles contenant du Pam₂CAG ou Pam₃CAG ont permis une sécrétion d'IL-6, de façon indépendante du KRN7000. En effet, les liposomes KRN7000 n'induisent aucune sécrétion, du fait de l'utilisation de DCs KO pour le CD1d. La présence du KRN7000 n'est donc pas perturbante pour la reconnaissance des adjuvants par les TLRs, avec des taux de sécrétion d'IL-6 légèrement inférieurs pour les liposomes KRN-Pam par rapport au Pam seul. On peut aussi noter que les liposomes KRN-Pam₂ et KRN-Pam₃ induisent des taux de sécrétions identiques, malgré le fait que le Pam₂ soit administré à une concentration dix fois inférieure à celle du Pam₃. Ces résultats confirment ceux obtenus par Béatrice Heurtault *et al.* au laboratoire.^[192]

L'équipe du Dr. Trottein a aussi testé ces constructions dans un modèle *in vivo* en contrôlant la sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-4. Pour cela, ils ont injecté à des souris 100 ng de KRN7000, formulé dans différents lots de liposomes (SUV-KRN, SUV-KRN-Pam₂CAG et SUV-KRN-Pam₃CAG). Afin de voir si le KRN7000 vectorisé active bien le système immunitaire, le sérum est prélevé à 4h (barres de couleurs claires) et 24h (barres de couleurs foncées) après administration, pour vérifier les taux de cytokines dans l'organisme. La figure IV.6 illustre les taux d'IFN- γ et d'IL-4.

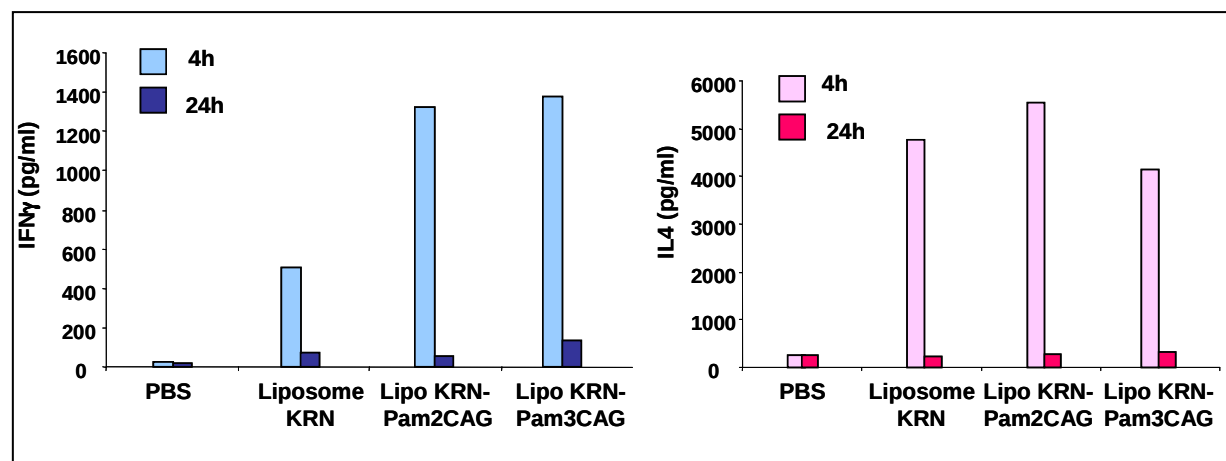


Figure IV.6 : Sécrétion cytokinique induite *in vivo* en fonction du temps.

Sur la figure IV.6 la cinétique observée est un peu différente de celle attendue. Comme nous l'attendions, l'IL-4 est présente en quantité importante au bout de 4h, mais on retrouve également de l'IFN- γ qui est censé n'apparaître qu'environ 6h après l'injection.^[187] On peut donc supposer que l'effet activateur des adjuvants Pam₂CAG et Pam₃CAG permet aux DCs de sécréter plus rapidement l'IFN- γ par rapport à des liposomes KRN7000 qui induisent un

taux environ 3 fois moindre à $t = 4h$. A ce temps on ne peut savoir si l'incidence est la même pour l'IL-4, car les taux sont quasi identiques pour les trois populations testées.

Pour conclure, les liposomes contenant des adjuvants des TLRs se sont montrés être spécifiques des DCs, car ils activent des DCs CD1d KO qui ne reconnaissent pas le KRN7000. L'activité de nos constructions *in vivo* s'illustre par une sécrétion d'IFN- γ plus rapide par rapport au liposome KRN7000 seul. Il serait toutefois nécessaire de refaire cette cinétique avec des temps intermédiaires entre 4 et 24h, afin de mesurer l'influence de nos constructions sur la cinétique de sécrétion d'IFN- γ .

F) Influence du peptide OVA sur la réponse immunitaire

L'objectif de l'utilisation du peptide OVA est de rendre la réponse immunitaire spécifique d'un antigène (ici OVA) dans le cadre d'un mélanome (présentant le récepteur OVA). Le peptide OVA a montré son intérêt dans le cadre de réponse anti-tumorale ciblée, en utilisant comme vecteur les particules liposomiques.^[190, 193, 194]

Les liposomes de type SUV encapsulent le KRN7000, présent à une concentration de 1,16 nmoles/ml (1 $\mu\text{g/ml}$). L'analogue du peptide OVA a été synthétisé avec soit la position C-terminale, soit la position N-terminale fonctionnalisée par un thiol libre. Ces analogues sont greffés sur une ancre fonctionnalisée DPG-Mal, comme illustré sur le schéma IV.3.

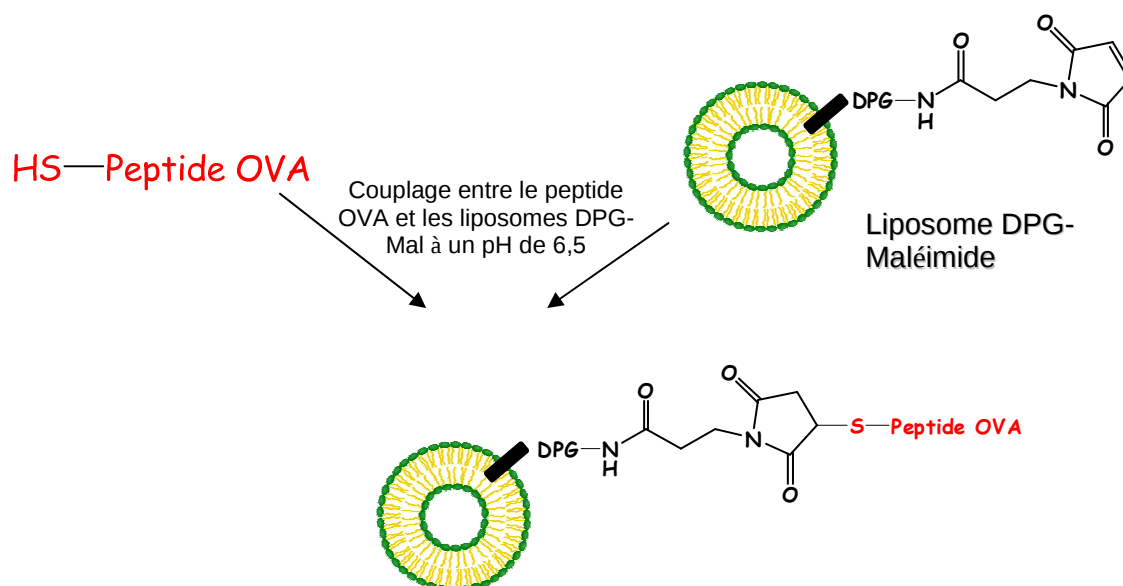


Schéma IV.3 : Greffage de l'analogue du peptide OVA sur une ancre DPG-Maléimide.

La concentration de DPG-Mal dans le liposome est de 0,3 μ mole/ml. Le couplage sur l'ancre DPG-Mal se fait en milieu tampon à pH 6,5. Le tableau IV.5 résume les caractéristiques des formulations.

Tableau IV.5 : Caractéristique des liposomes SUV $\pm$ KRN et $\pm$ peptide.

	Liposomes SUV-KRN	Liposomes SUV-KRN C-OVA	Liposomes SUV- C-OVA	Liposomes SUV-KRN OVA-C	Liposomes SUV- OVA-C
Concentration de KRN7000 (nmoles/ml)	1,16	1,16	/	1,16	/
Taux de greffage des peptides OVA	/	100% (0,15 μ mole/ml)	99% (0,15 μ mole/ml)	100% (0,15 μ mole/ml)	89% (0,13 μ mole/ml)
Taille (nm)	73 $\pm$ 1	98 $\pm$ 12	76 $\pm$ 10	86 $\pm$ 7	70 $\pm$ 12
Indice de polydispersité	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Toutes les formulations ont été testées *in vitro* sur des splénocytes issus d'une part de souris dite Wild-type (WT), et d'autre part de souris OT-1. Ces dernières ont la caractéristique d'exprimer le récepteur OVA sur leurs splénocytes et lymphocytes T-CD8⁺. Lors des différents tests, seule la production d'IFN- γ est mesurée.

Sur la figure IV.7, nous présentons en A les taux de sécrétion issus du premier test, qui illustrent la prise en charge par les splénocytes de souris OT-1 du peptide C-OVA et OVA-C non vectorisé, et du peptide vectorisé en présence ou non de KRN7000. Le graphique en B. illustre l'état de la réponse cytokinique après administration aux splénocytes de souris WT, soit de KRN7000 libre, soit de liposomes KRN7000 avec ou sans peptides C-OVA ou OVA-C.

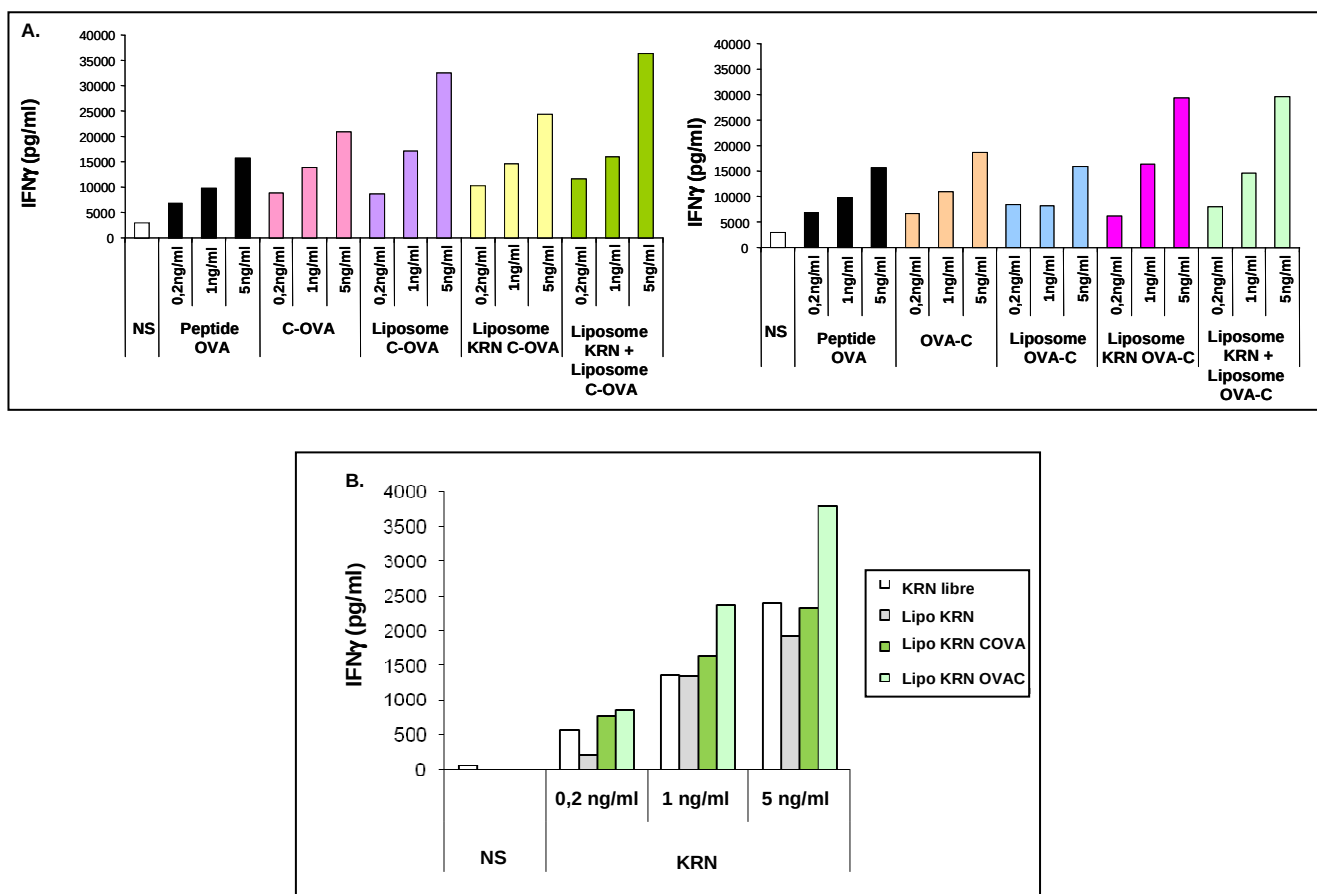


Figure IV.7 : Influence de la présence des peptides OVA-C et C-OVA sur la sécrétion d'IFN- γ . A. Sur les graphiques les axes des abscisses représentent les concentrations en peptide. La concentration en KRN dépend de celle du peptide. B. Sur le graphique, l'axe des abscisses illustre la concentration en KRN7000. La concentration en peptide C-OVA ou OVA-C dépend de la valeur de KRN7000.

Sur les deux premiers graphiques de la figure IV.7 en A, on constate que tous nos échantillons répondent de manière dose dépendante en fonction de la concentration en peptide OVA-C et C-OVA (comprise entre 0,2 et 5 ng/ml).

Concernant l'activité cytokinique sur les graphiques en A de la figure IV.7, nos analogues du peptide OVA (C-OVA et OVA-C) sont bien pris en charge par les splénocytes, avec une réponse similaire au peptide OVA témoin. Donc l'ajout d'une cystéine n'induit pas de modification de leur activité biologique quelle que soit l'extrémité de fixation. Les liposomes C-OVA et OVA-C permettent aussi au peptide vectorisé d'être pris en charge, avec une réponse légèrement meilleure pour les liposomes C-OVA par rapport au peptide OVA témoin. Les liposomes KRN-C-OVA et liposomes KRN-OVA-C sont aussi pris en charge, avec une réponse légèrement meilleure que les peptides témoins OVA-C et C-OVA. Le mélange physique des liposomes KRN avec les liposomes C-OVA ou les liposomes OVA-C apporte lui aussi une meilleure réponse cytokinique que le témoin (peptide OVA).

Le graphique B de la figure IV.7 présente les formulations stimulant les splénocytes de souris WT. On observe que tous les liposomes induisent la production d'IFN- γ , mais on remarque que les liposomes KRN-OVA-C ont une activité plus importante que les liposomes KRN-C-OVA. L'activité de ces deux populations est supérieure au KRN libre, et ce quelle que soit la concentration utilisée.

Les tests effectués avec les analogues du peptide OVA permettent de conclure que ces deux analogues sont actifs *in vivo* dans les deux modèles étudiés (splénocytes de souris OT et WT). On notera que le peptide OVA-C est reconnu, provoquant un taux de sécrétion d'IFN- γ chez la souris WT 1,5 fois plus important lorsqu'il est associé à du KRN7000 au sein de liposomes. Il serait donc intéressant d'observer *in vivo* l'influence de cette optimisation sur la lutte anti-tumorale.

G) Conclusion

Dans le cadre de l'optimisation de la réponse immunitaire anti-tumorale, nous avons testé nos différentes constructions liposomiques sur des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Les liposomes SUV et REV encapsulant le KRN7000 ont montré leur capacité à présenter notre ligand d'intérêt aux DCs, ainsi qu'aux cellules NKTs. Par la suite nous avons formulé des liposomes de type SUV-KRN-PEG₂₀₀₀ et REV-KRN-PEG₂₀₀₀, qui ont montré de façon équivalente, leur capacité à être pris en charge par les cellules immunitaires.

Notre objectif a été ensuite d'optimiser et évaluer les constructions en utilisant différentes stratégies. Le ciblage des DCs a été effectué grâce à différents composés, comme le DOG-DiMannose ou les fragments d'anticorps anti-CD11c. Dans ces deux cas, les résultats *in vitro* sont encourageants, car on note une activité cytokinique à peu près égale au KRN libre. Néanmoins il est difficile de mettre en évidence l'intérêt d'un ciblage *in vitro* car les cellules sont directement en contact avec les constructions. C'est pourquoi ces résultats devront maintenant être confirmés *in vivo*, afin de vérifier l'influence de nos deux molécules sur l'optimisation de la réponse immunitaire.

L'association de ligands des récepteurs TLR 2/1 et 2/6 au KRN7000, au sein de liposomes induit une activation des DCs CD1d indépendante *in vitro*. *In vivo* la quantité d'IFN- γ 4h après l'administration est deux fois plus importante quand le KRN7000 est associé à l'un des deux ligands par rapport à la formulation KRN seul. Ceci laisse penser qu'il est possible d'optimiser la réponse immunitaire, en faisant intervenir plus tôt la sécrétion d'IFN- γ .

Nous avons aussi cherché à optimiser la réponse anti-tumorale en utilisant deux analogues du peptide OVA. Sur des splénocytes issus de modèles spécifiques comme les souris OT-1, nos peptides OVA-C et C-OVA ont répondu favorablement, avec ou sans KRN7000. Le même test sur des splénocytes issus de souris « sauvage », a montré une optimisation de la réponse immunitaire avec une forte hausse de la sécrétion cytokinique pour les formulations contenant le peptide OVA-C lorsqu'il est associé au KRN7000. La mise en place d'un modèle *in vivo* donnera des indications supplémentaires sur l'efficacité du couple KRN7000 / peptide OVA-C dans un même modèle.

Dans la deuxième partie de l'optimisation de la réponse immunitaire du KRN7000, nous traiterons plus particulièrement la levée du phénomène d'anergie.

III) Résultats et discussions sur la levée de l'anergie

L'anergie est un phénomène qui limite la réponse immunitaire dans le temps. En effet, la réadministration de ligands induit une inactivation des cellules iNKT qui se traduit par une absence de sécrétion de cytokines. L'anergie dépendrait d'une part de la cellule prenant en charge le ligand, et d'autre part de la taille de la molécule prise en charge. C'est donc dans l'optique de lever l'anergie que l'équipe du Dr. François Trottein a mis en place un test *in vivo* permettant de voir l'influence de nos formulations sur ce phénomène anergique.

Dans un premier temps, nous vérifions donc l'influence de la furtivité et de la taille des vecteurs encapsulant du KRN7000, et dans un deuxième temps, nous vérifions l'influence du ciblage des DCs sur ce phénomène.

A) Influence de la furtivité et de la taille des vecteurs

Les liposomes utilisés pour ce test sont ceux présentés dans le paragraphe II).B) : des liposomes SUV et REV KRN-PEG₂₀₀₀. Brièvement, le protocole mis en place par l'équipe du Dr. Trottein est celui illustré sur le schéma IV.5.

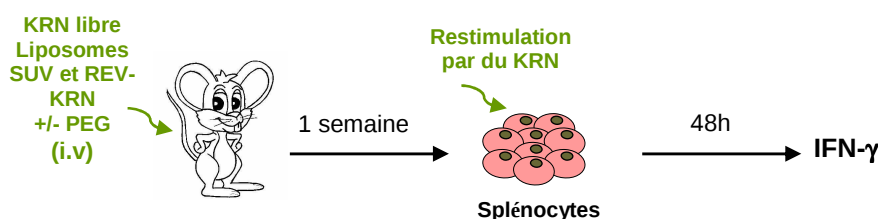


Schéma IV.5 : Protocole d'administration des formulations SUV et REV-KRN +/- PEG.

100 ng de KRN7000 Tween (KRN7000 dissous dans le tensio-actif Tween 20 à 0,5%) ou de KRN vectorisé en présence ou non de PEG₂₀₀₀, sont administrés à des souris C57BL/6. Après une semaine, celles-ci sont sacrifiées et les splénocytes prélevés. Ces derniers sont à nouveau stimulés par du KRN7000 libre et le taux d'IFN- γ est mesuré au bout de 48h. La figure IV.10 présente la mesure du taux de sécrétion de l'IFN- γ .

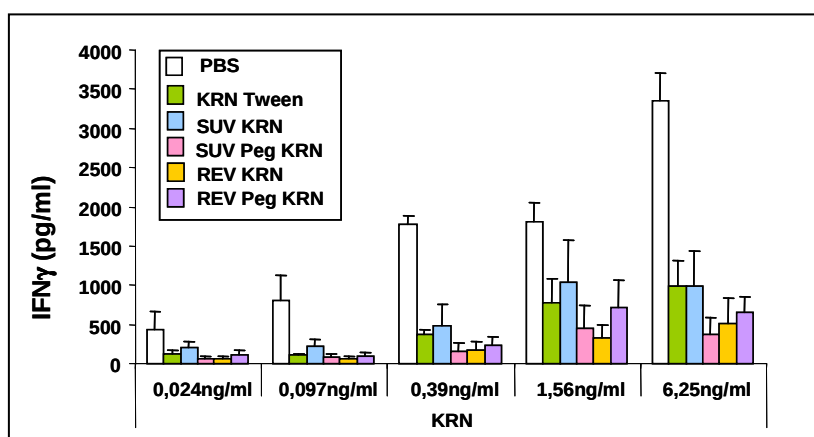


Figure IV.10 : Influence de la taille du liposome et de l'insertion du PEG₂₀₀₀ sur la sécrétion d'IFN- γ .

Les souris ayant subi une injection de PBS (barres blanches) en début de test servent de contrôle pour la réponse au ligand. En effet lors du sacrifice de ces souris, les splénocytes prélevés sont mis en contact avec du KRN7000 pour la première fois seulement, donc on ne devrait pas observer d'anergie. Et effectivement, le lot PBS exprime de l'IFN- γ de façon intense.

Le lot KRN7000 libre (appelé KRN Tween sur la figure IV.10) est notre contrôle positif pour l'anergie. On l'observe sur la figure IV.10 avec les barres vertes qui traduisent une nette diminution du taux de cytokine en comparaison du lot PBS. Le phénomène d'anergie est donc présent dans ce cas.

De même pour le lot SUV-KRN (barres bleues) qui possède des taux comparables au KRN7000 libre en terme de sécrétion cytokinique.

Les lots REV-KRN (barres oranges) et REV-KRN-PEG₂₀₀₀ (barres violettes) sont les lots pour lesquels les tailles des vecteurs ont été augmentées. Ces populations avaient montré une

prise en charge aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Mais leur efficacité dans la levée de l'anergie n'est pas avérée, car ni la taille supérieure du vecteur (380nm pour REV et 100nm pour SUV), ni l'incorporation de PEG₂₀₀₀ pour augmenter la durée de vie du liposome ne permettent de lever l'anergie. Les taux de cytokine étant très inférieurs à celui du lot PBS.

Dans une étude à laquelle nous avons participé, nous avons également démontré parallèlement, avec Elodie Macho-Fernandez *et al.*,^[195] que l'utilisation de particules polymères plus grandes ne permet pas de lever l'anergie des NKTs. Il s'agissait cette fois de microparticules de PLGA encapsulant du KRN7000 et possédant une taille d'environ 750 nm. Après avoir montré que ces particules étaient bien pris en charge par les cellules immunitaires dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, elles ont été testées dans le cadre de la levée de l'anergie des cellules NKTs. Malheureusement, l'anergie était toujours présente après réadministration de ligand, qu'il soit sous forme de KRN7000 libre ou encapsulé dans les microparticules.

Tout ceci est en contradiction avec les travaux de Thapa *et al.*,^[63] supposant que ce qui permettrait de lever l'anergie serait des particules de taille supérieure à 200 nm, permettant d'éviter les cellules B. Finalement l'ensemble de ces résultats ne confirme pas l'intérêt d'augmenter la taille des particules pour lever l'anergie.

B) Influence de l'activation des TLRs sur l'anergie

Les liposomes utilisés pour ce test sont ceux présentés dans le paragraphe II).D) : des liposomes SUV incorporant des adjuvants des TLR 2/1 et 2/6, ainsi que du KRN7000. Brièvement, le protocole mis en place par l'équipe du Dr. Trottein est présenté sur le schéma IV.6.

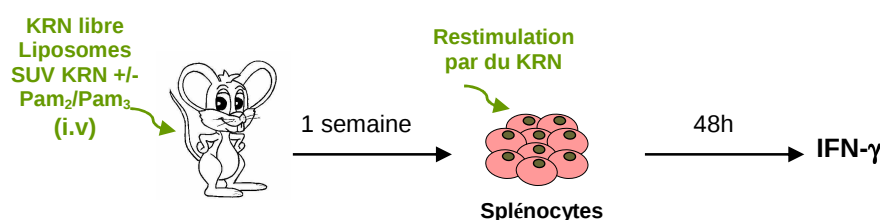


Schéma IV.6 : Protocole d'administration des formulations SUV encapsulant des ligands de TLRs.

100 ng de KRN7000 Tween ou de KRN vectorisé en présence ou non de ligand des TLRs, sont administrés à des souris C57BL/6. Après une semaine les souris sont sacrifiées et les splénocytes à nouveau stimulés par du KRN7000 libre et le taux d'IFN- γ est mesuré au bout de 48h. La figure IV.11 présente la mesure du taux de sécrétion de l'IFN- γ .

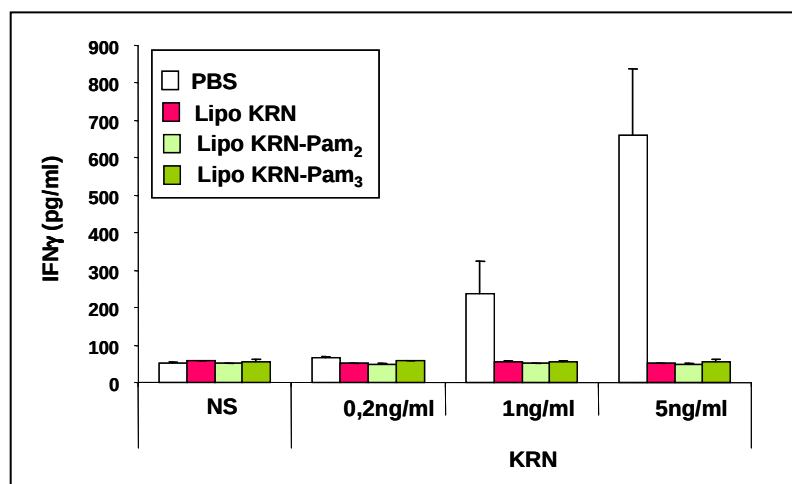


Figure IV.11 : Influence de l'insertion de ligand de TLRs sur la levée de l'anergie.

Comme précédemment les souris ayant reçu une injection de PBS (barres blanches) répondent négativement, à savoir que l'on observe une anergie se traduisant par la production d'IFN- γ . Malheureusement les deux constructions liposomiques encapsulant le KRN7000 et les adjuvants, n'ont pas permis de lever l'anergie.

La maturation des DCs ne semble pas être la solution à la levée de l'anergie. Mais dans ce test, le KRN7000 est présent en même temps que le ligand du TLR. Il serait donc intéressant de séparer nos adjuvants du KRN7000. En effet, la réponse au KRN7000 étant assez rapide, l'idée serait de laisser le temps aux DCs de maturer avant de leur présenter le ligand. Des premiers tests *in vitro* ont été effectués chez le Dr. Trottein à Lille sur des DCs de souris WT (data non présentées). Avec un calendrier différent, nos constructions sont bien prises en charge par les splénocytes, qu'elles contiennent du Pam₂, du Pam₃ ou du KRN7000. Il reste à tester ces constructions *in vivo* afin d'observer l'influence de la primo maturation des DCs sur l'apparition ou la levée de l'anergie.

C) Conclusion

Dans cette partie, le but a été d'optimiser la réponse immunitaire en levant l'anergie des cellules NKTs. Les formulations testées (SUV-KRN $\pm$ PEG ; REV-KRN $\pm$ PEG ; SUV-KRN-adjuvants des TLR) n'ont pas apporté les réponses espérées.

Comme nous l'avons décrit, l'équipe du Dr. Trottein a utilisé des microparticules de PLGA qui n'ont également eu aucun impact sur la levée de l'anergie.^[195] La taille des particules présentées ne semblent pas avoir d'incidence sur ce phénomène, en contradiction avec les résultats obtenus par Thapa *et al.*^[63] Cette différence peut venir de la nature des particules

utilisées (PLA vs PLGA ou liposomes) et/ou de la méthode de formulation du ligand qui pourrait influencer sa délivrance et sa disponibilité.

Pour cibler des DCs, Fujii *et al.*^[61] et Stirnemann *et al.*^[196], ont montré respectivement que l'injection répétée d'un complexe α -GalCer/DCs purifiée et d'un complexe α -GalCer/tetramère de CD1d, permettent par la suite l'administration répétée de ligand, sans que l'anergie apparaissent. En utilisant ces systèmes, ils ont ainsi pu éviter la prise en charge du ligand par les cellules B, responsables de l'anergie des cellules NKTs.^[61] Le ciblage de récepteurs des DCs semblent donc être la solution permettant de lever l'anergie. Malheureusement, notre méthode de ciblage des TLR 2/1 et 2/6 (récepteurs spécifiques des DCs) n'a pas suffi à obtenir une réponse cytokinique répétable dans le temps. Peut-être aurait-il fallu, à l'instar des travaux cités précédemment, restimuler l'organisme étudié par notre formulation et non par le ligand libre, afin de garder la notion de ciblage. Car même si Fujii et Stirnemann ont montré que l' α -GalCer libre permet par la suite d'apporter une réponse immunitaire, l' α -GalCer complexé directement aux DCs ou à la molécule du CD1d montre une réponse encore plus efficace.

Conclusion générale et perspectives

I) Conclusion générale

Durant ce travail de thèse, notre but a été d'augmenter l'efficacité du KRN7000, en optimisant la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans une première partie nous avons travaillé sur la synthèse de nouveaux analogues de l' α -GalCer KRN7000. Dans une deuxième partie, nous avons cherché à optimiser la réponse anti-tumorale grâce à la vectorisation du KRN7000.

Dans la première partie, nous avons synthétisé différentes molécules analogues du KRN7000, dans le but d'obtenir des composés ayant un profil de sécrétion de cytokines majoritaire de type Th1. Ce profil permet la sécrétion d'IFN- γ par les cellules iNKTs, activant notamment les lymphocytes T-CD8⁺ et les cellules NKs, ayant un rôle dans la réponse anti-tumorale. Pour cela, nous nous sommes basés sur les molécules décrites dans la littérature, et qui possèdent la caractéristique d'induire une réponse pro-Th1 plus marquée que le KRN7000. Nous avons pris comme modèle les composés synthétisés par Fujio *et al.*^[112] et Trappeniers *et al.*,^[89, 108] dont les molécules ont montré un profil pro-Th1. Fujio *et al.* ont utilisé un groupement phényle à l'extrémité de l'une des chaînes grasses raccourcies. Trappeniers *et al.* ont utilisé des groupements aromatiques en position C6 du sucre. Le profil pro-Th1 de ce type de molécules viendrait de la présence de « π -stacking » entre ces groupements aromatiques et des acides aminés possédant un cycle aromatique sur leur chaîne latérale, stabilisant ainsi ces composés lorsqu'ils sont pris en charge par le CD1d.

Nous avons ainsi choisi de combiner sur une même molécule, d'une part l'ajout d'un groupement phényle au bout de l'une des chaînes grasses, et d'autre part de modifier la position C6 du sucre, en fonctionnalisant cette position par une amine primaire, afin d'y greffer diverses fonctions. L'objectif étant de maximiser le profil pro-Th1 de ces analogues.

Les premiers tests effectués sur ces analogues ont montré qu'ils étaient bien pris en charge par les splénocytes, à l'instar du KRN7000. Concernant la sécrétion des cytokines IL-4 et IFN- γ , nous avons pu constater que les taux étaient plus faibles que ceux observés pour le KRN7000. Ces résultats et les ratios calculés nous indiquent que nos analogues ont plutôt un profil pro-Th2, alors que nous recherchions le profil pro-Th1. Cela nous indique aussi que la combinaison du groupement phényle sur l'une des chaînes grasses, avec une fonctionnalisation de la position C6, n'est pas la stratégie à utiliser pour obtenir des analogues majoritairement pro-Th1. On peut supposer que ces doubles modifications perturbent la prise en charge des ligands par le CD1d, plutôt que de les stabiliser.

Néanmoins, le profil pro-Th2 est également intéressant car cette voie est utilisée dans la lutte contre les maladies auto-immunes. Ceci serait à confirmer lors de tests *in vivo* qui permettraient de voir le comportement de nos molécules au sein d'un organisme.

L'autre point important concerne le KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ qui a été testé dissous dans un milieu physiologique, ou dans du DMSO (utilisé traditionnellement pour dissoudre les α -GalCer). Les tests ont montré que les deux méthodes de dissolution permettaient d'obtenir une réponse quasi identique, avec un profil pro-Th2 marqué. L'ajout du PEG a donc bien un effet positif sur la solubilité de la molécule, ce qui permet d'envisager une administration *in vivo* en utilisant la molécule simplement dissoute dans du tampon physiologique.

En parallèle nous avons synthétisé des analogues fluorescents qui ont permis d'identifier quel type de souche de cellules dendritiques prend en charge le ligand α -GalCer, et le présente aux cellules iNKTs. Le KRN-FITC et le KRN-Cy5 se sont tous les deux montrés actifs, mais seul le KRN-Cy5 permettait d'identifier par fluorescence les cellules dendritiques lors des tests effectués (la longueur d'onde d'émission du FITC était trop faible pour être détectée par cytométrie de flux). Cela a permis de découvrir qu'un seul sous-type de cellules dendritiques (DC CD4⁻) présentait le ligand aux cellules iNKTs *in vivo*. Il reste à ce jour à définir si ces DCs (CD4⁺ et CD4⁻) ont un comportement similaire avec des analogues d' α -GalCer ou des ligands physiologiques. Pour cela, de nouvelles études sont nécessaires.

Dans la seconde partie de ce travail, l'objectif est d'augmenter l'efficacité de la délivrance du ligand, en le vectorisant dans des liposomes pour augmenter la biodisponibilité du KRN7000 (modifier la taille du vecteur ; ajout d'un PEG₂₀₀₀), cibler les cellules dendritiques (par le récepteur mannose ou CD11c) ou stimuler la réponse immunitaire adaptative (mâtrer les DCs *via* les TLRs ; utilisation d'un analogue du peptide OVA).

Toutes ces formulations ont montré qu'elles sont prises en charge par les cellules immunitaires, mais seule la formulation insérant du KRN7000 et des ligands des TLR (Pam₂CAG ou Pam₃CAG) a montré une amélioration de la sécrétion de cytokines *in vivo*, avec une sécrétion d'IFN- γ intervenant plus tôt que pour la formulation avec le KRN7000 seul. La maturation des DCs aurait donc un impact sur la sécrétion des cytokines.

Nous avons aussi utilisé un peptide d'intérêt qui permet de polariser la réponse vers un modèle tumorale prédéfini. Nous avons utilisé un analogue du peptide OVA dans un modèle *in vitro*. Les résultats ont montré une activité intéressante pour le peptide OVA mis en présence de KRN7000, notamment dans le cas de la stimulation de splénocytes issus de souris WT. L'activité cytokinique observée a ainsi été deux fois supérieure à celle observée pour le

KRN7000, illustrant une amélioration de la réponse immunitaire. Il reste à confirmer ces résultats *in vivo*.

Dans un second temps pour optimiser la réponse immunitaire, nous avons voulu lever l'anergie des cellules NKTs, phénomène qui apparaît après une première stimulation par un ligand. Comme le laissait supposer la littérature, ce phénomène apparaîtrait à cause d'un manque de spécificité dans la délivrance du ligand. C'est pourquoi pour augmenter cette délivrance, nous avons vérifié l'influence de tailles différentes de vecteur, ainsi que la furtivité de ces particules grâce à l'usage de PEG₂₀₀₀. Nous avons également tenté d'accentuer la maturation des DCs grâce aux ligands des TLRs 2/1 et 2/6. Toutes nos formulations étaient bien prises en charge *in vitro* et *in vivo*, mais ni le fait de maturer les cellules dendritiques, ni l'utilisation de particules de tailles supérieures à 500 nm (comme ont pu le montrer Macho-Fernandez *et al.*^[195]) n'ont empêché l'apparition de l'anergie. Ceci signifie que le manque de spécificité dans la délivrance du ligand n'est à priori pas la cause de ce phénomène.

Pour résumer, nous avons dans ce travail synthétisé des analogues du KRN7000 qui sont reconnus par le système immunitaire et pris en charge par les DCs et les cellules iNKTs. Le KRN-Phe-PEG₂₀₀₀, soluble en milieu aqueux conserve une activité similaire à son homologue dissous dans un solvant organique. Ceci est très important dans le cadre d'une administration *in vivo*, car cela permet d'une part d'éviter les effets toxiques du DMSO, et d'autre part d'éviter l'utilisation d'un transporteur pour solubiliser la molécule dans un milieu physiologique.

Concernant l'optimisation de la réponse immunitaire anti-tumorale, on retient que seules les formulations liposome KRN7000-ligand des TLRs 2/1 ou 2/6, et liposome KRN7000-peptide OVA-C ont montré une amélioration de la réponse. La première permet une sécrétion plus rapide d'IFN- γ que le liposome KRN7000, la deuxième conduit à un taux de sécrétion de cytokines IFN- γ plus élevé que le KRN7000. Cependant, aucune des formulations n'a permis de lever le phénomène d'anergie.

II) Perspectives

Concernant les perspectives pour la partie sur la synthèse des analogues d' α -GalCer, le ratio cytokinique obtenu pour nos différents analogues *in vitro*, ainsi que le profil pro-Th2 observé doivent être confirmés lors de tests *in vivo*. Ceci pour voir l'influence de nos analogues sur la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4. Il serait également possible de formuler des liposomes encapsulant nos analogues, pour observer l'influence de la vectorisation sur la prise en charge du ligand et sur la réponse immunitaire.

Dans la littérature, on ne trouve quasiment pas d'analogues d' α -C-GalCer ou d' α -S-GalCer ayant une modification sur une chaîne grasse ou sur le sucre. L'analogue α -S-GalCer ayant été déjà synthétisé au laboratoire, il pourrait donc être intéressant de modifier la position C6 du sucre par exemple ou de fonctionnaliser une des chaînes grasses. Le but étant d'obtenir des composés plus actifs. Il serait aussi possible d'envisager des modifications sur un composé de type α -C-GalCer, reconnu pour avoir un profil pro-Th1.

Concernant les perspectives pour la partie sur l'optimisation de la réponse anti-tumorale par la vectorisation du KRN7000, il faudrait en premier lieu tester les formulations contenant l'ancre dimannose et l'anticorps anti-CD11c dans des tests *in vivo* pour constater leur influence sur la réponse immunitaire.

Pour l'optimisation de la réponse anti-tumorale grâce à l'emploi de peptides d'intérêts, il nous faudrait valider les constructions KRN-OVA-C dans un modèle *in vivo* chez des souris OT-1 ou WT (le liposome formulé avec le KRN7000 et le peptide OVA-C a montré un taux d'IFN- γ deux fois plus élevé que le liposome KRN7000 lors d'un test *in vitro* avec des splénocytes de souris WT).

Pour le phénomène d'anergie, on a vu que ni la taille, ni la furtivité n'avaient d'impact sur ce phénomène. De même, la maturation des DCs n'a pas permis de lever l'anergie. Une des pistes à explorer serait celle de récepteurs de co-stimulation des cellules iNKTs. Comme on pu le montrer Iyoda *et al.*, la compréhension du phénomène est complexe car l'anergie fait intervenir différents paramètres.^[197] Une des idées serait d'encapsuler dans le cœur hydrophile du liposome de l'IL-2, connu pour permettre de régénérer la production de cytokines par les iNKTs, en essayant dans le même temps de bloquer les récepteurs de co-stimulation comme le CD3, le CD28 ou le PD-1 présents sur les cellules T. En effet, le récepteur PD-1 (Programmed Death-1) est présent sur les cellules NKTs, et ses ligands PD-L1 (appelé aussi B7-H1 ou CD274) et PD-L2 (appelé aussi B7-DC ou CD273) présents sur les APC. Le

blocage de ces entités a montré des effets positifs sur la levée de l'anergie,^[198] tout comme l'utilisation de souris PD-1 KO qui se sont montrées résistantes à l'anergie.^[199]

Parties expérimentales biologique et chimique

I) Partie expérimentale biologique

A) Mesures physiques

1) Mesures spectrophotométriques et spectrofluorométriques

Le spectromètre UV-Visible est un appareil Uvikon 930 (Kontron Instruments). Les mesures fluorométriques ont été effectuées sur un spectrofluorophotomètre RF-53001 PC Séries (Shimadzu Co., Kyoto, Japon) en utilisant des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

2) Mesure de la taille des liposomes

La taille des liposomes a été déterminée sur un appareil Nano ZS (Malvern Instruments, Paris, France) par diffusion dynamique de la lumière. Cette technique permet de mesurer la taille de suspensions colloïdales de quelques nm à quelques microns. Le principe de cette méthode repose sur le mouvement brownien des particules en suspension. Les particules sont traversées par un faisceau laser He-Ne à 632 nm et le signal mesuré correspond aux variations de la lumière diffusée, dues aux mouvements browniens des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique pour obtenir sa fonction d'auto-corrélation. Cette fonction correspond à la probabilité qu'a une particule de rester au même point de l'espace entre le temps t et le temps $t + \tau$. Ainsi plus la particule est petite, plus cette probabilité est faible et inversement. Les spécifications de la mesure sont les suivantes : temps d'acquisition 30 s ; 3 mesures par échantillon ; la viscosité du milieu varie en fonction du tampon utilisé. Elle est donc de 1,014 pour un tampon HEPES 10 mM, 5% (p/v) sorbitol (50 mg dans 1 ml de solution) et 1,145 pour un tampon HEPES 10 mM, 145 mM NaCl ; angle de diffusion 90° ; température 25°C. Les mesures de taille en fonction de l'intensité ont été analysées en utilisant un logiciel de distribution inclus avec l'appareil. La mesure est effectuée avec 20 μ l d'échantillon dilué dans 980 μ l de tampon utilisé pour la formulation.

B) Dosages

1) Dosage des phospholipides

a) Dosage du phosphate inorganique

Le dosage du phosphate inorganique est utilisé suivant la méthode décrite par Rouser *et al.*, pour quantifier les solutions stocks de phosphatidylglycérol (PG) et de phosphatidylcholine (PC).^[200] Une gamme étalon est préparée avec du KH_2PO_4 (0, 25, 50 et 75 $\mu\text{mol/ml}$) et les fractions aliquotes de l'échantillon à doser sont en triplicata, et placées dans des tubes en pyrex puis séchées à l'étuve pendant 1 nuit à 110°C. Chaque tube, après addition de 300 μl d'acide perchlorique à 70%, est recouvert d'une bille de verre puis chauffé pendant 20 minutes entre 180°C et 200°C afin de générer du phosphate inorganique par minéralisation.^[200] Après cette étape de chauffage, on ajoute successivement 1 ml d'eau milli-Q, 500 μl de molybdate d'ammonium à 1,25 % (p/v) et 500 μl d'acide ascorbique à 5% (p/v). Les échantillons sont vortexés puis placés 5 minutes dans un bain-marie bouillant. On observe l'apparition d'une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phosphate présente. La densité optique est mesurée à 820 nm avec un spectrophotomètre.

b) Dosage de la phosphatidylcholine par méthode enzymatique

Ce type de dosage enzymatique est utilisé pour déterminer spécifiquement la quantité de PC présente dans les liposomes, suivant la méthode décrite par Takayama *et al.*^[201] Il s'agit d'une méthode colorimétrique pour laquelle on utilise un kit (LabAssay Phospholipids, Wako Chemicals GmbH). La méthode de quantification de la PC se déroule par une première étape d'hydrolyse de la PC en choline libre par la phospholipase D. La deuxième étape consiste ensuite en la réaction de la choline libérée qui est oxydée par la choline oxydase, et produit du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier va ensuite réagir avec la 4-aminoantipyrine et du phénol pour donner un chromogène bleu, qui possède une absorbance maximum à 505 nm. Nos échantillons à doser sont fractionnés en aliquotes de 2 à 5 μl et déposés par triplets sur une plaque 96 puits où l'on ajoute 200 μl de réactif enzymatique dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 15 minutes à 37°C puis la mesure de la densité optique est effectuée à 490

nm (filtre) dans un lecteur de microplaques. Une gamme étalon est réalisée avec la solution standard de choline fournie dans le kit.

2) Dosage des peptides

a) Dosages des protéines avec le kit BCA (Interchim, Pierce)

Ce test est utilisé pour doser les fragments d'anticorps se trouvant sur les liposomes, ainsi que les concentrations de fragment Fab' libre.

Le principe du test est basé sur la réduction alcaline du cuivre II en cuivre I en présence de protéine. Le cuivre I libéré se complexe alors avec 2 molécules d'acide bicinchoninique (BCA) pour donner un chromogène dont l'absorbance est maximale pour $\lambda = 562$ nm. La Figure 1 illustre ces réactions.

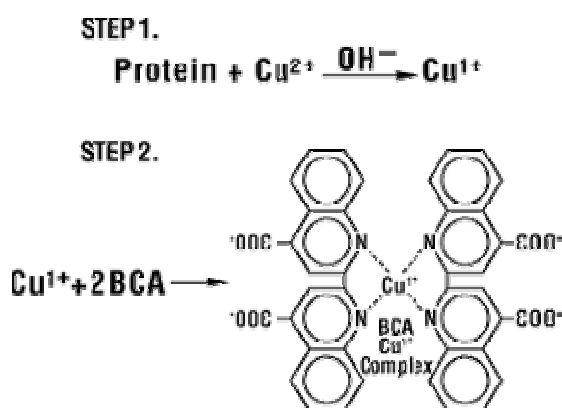


Figure 1 : Formation d'un chromogène pour le dosage de protéines à l'aide de BCA

Des aliquotes de 5 à 20 μl de suspensions de liposomes à doser sont déposés par triplicat sur une plaque 96 puits. Le volume dans chaque puits est ajusté à 50 μl avec de l'eau milli-Q. Une gamme étalon est constituée d'aliquotes contenant la même quantité de liposomes blancs auxquels on ajoute une quantité connues de fragment Fab' libre (10 ou 40 $\mu\text{g/ml}$).

Dans tous les puits, ajustés à 50 μl avec de l'eau milli-Q, on ajoute 200 μl de réactif BCA. La plaque est incubée pendant 30 minutes à 60°C, et les densités optiques sont lues à 570 nm dans un lecteur de microplaque 96 puits.

b) Dosage des peptides avec la méthode de la fluorescamine

Un dosage fluorimétrique des fonctions amines est basé sur la méthode de Böhlen a été utilisé.^[202] Des aliquotes de la préparation liposomale à doser (5 à 50 μ l, qsp 50 μ l avec H₂O) sont hydrolysés pendant 12 heures à 110°C en présence de 50 μ l de HCl 12N pour libérer les acides aminés de nos constructions liposomales. Le milieu est ensuite neutralisé par addition de 100 μ l de soude 6M et les fonctions amines libres sont quantifiées par un dosage à la fluorescamine (Figure 2). Dans ce but, 80 μ l de l'hydrolysats (contenant de 0 à 105 nmoles d'amines) est mélangé à 1,5 ml de tampon borate de sodium 50 mM (pH 9,0) et à 500 μ l de solution de fluorescamine extemporanément dissous dans du dioxane (30 mg/100 ml). Après homogénéisation rapide, la mesure de la fluorescence est effectuée à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et à une longueur d'onde d'émission de 475 nm. La gamme étalon est obtenue dans les mêmes conditions par hydrolyse de peptides dont la quantité est connue. L'hydrolyse d'une préparation liposomale (liposomes blancs) sans peptide permet de déterminer la contribution des phospholipides à la fluorescence totale.

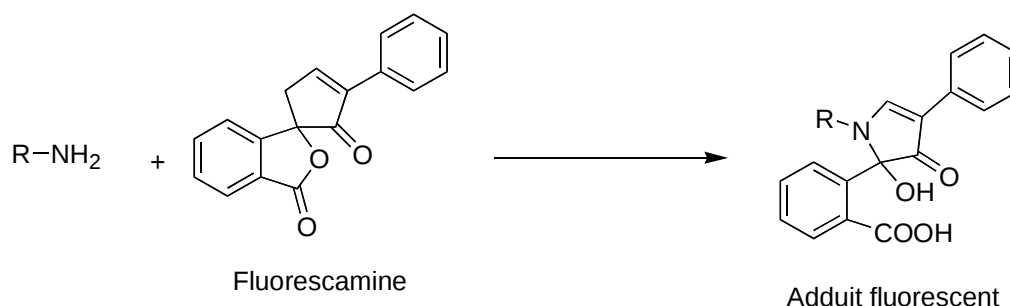


Figure 2 : Principe du dosage des fonctions amines avec la fluorescamine

C) Fabrication des fragments Fab' neutre et anti-CD11c

Les anticorps entiers sont des IgG non relevant ou anti-CD11c, issus de rat. Ils sont fournis par Thermo Fisher Scientific et transformés en F(ab')₂ par une méthode enzymatique, grâce au kit fourni avec les anticorps entiers. Ce travail a été effectué au sein du laboratoire du Dr. François Trottein à Lille.

Une fois les fragments F(ab')₂ obtenus, ils sont transformés en fragments Fab' suivant la méthode décrite par Dufresne *et al.*^[189] Pour cela, les fragments F(ab')₂ sont mis en présence de β -mercaptoethylamine pendant 90 min à 37°C sous atmosphère d'argon. Cela va permettre de couper les ponts disulfures se trouvant entre les chaînes lourdes et légères. L'étape suivante

consiste en la purification des fractions sur colonne Sephadex G25 (GE Healthcare) avec pour éluant un mélange acétate de sodium 100 mM, NaCl 88 mM et EDTA 1 mM, à pH 6,5. Les fragments de tailles supérieures à 5kD sont exclus du gel et sortent en premier. Nous récupérons des fractions de 1mL. Un dosage BCA est nécessaire pour identifier les fractions possédant les fragments Fab'. Les fractions sont ensuite rassemblées et concentrées à l'aide de Centricon-10 (Amicon) et resuspendues dans le mélange acétate-NaCl-EDTA à pH 6,5. La concentration en Fab' est déterminée par un dosage BCA. La coupure des F(ab')₂ en Fab' est quantitative.

La figure 3 résume le cheminement pour l'obtention des fragments Fab' à partir des IgG.

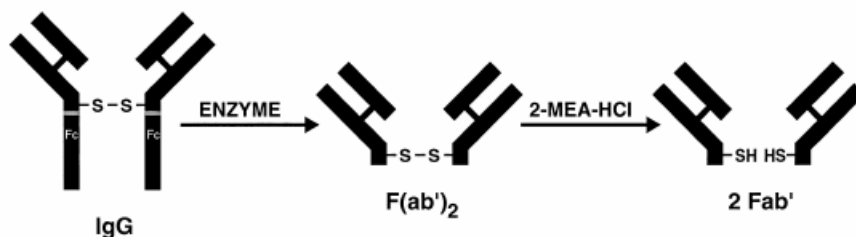


Figure 3 : Obtention des fragments Fab' à partir des IgG

D) Analogue du peptide OVA

Le peptide OVA a été fonctionnalisé du côté C ou N-terminal par une cystéine, au sein du laboratoire d'Immunologie et Chimie Thérapeutiques (IBMC – Strasbourg – UPR 9021 –). Les séquences synthétisées sont (SIINFEKL-**C**) et (**C**-SIINFEKL), et correspondent aux acides aminés 257-264 de l'ovalbumine.

E) Fabrication des liposomes

1) Les matières premières et molécules synthétiques

a) Les constituants phospholipidiques

La base de nos liposomes est constituée de PC, PG et de Cholestérol (Chol). La PC utilisée est de la L- α -phosphatidylcholine de jaune d'œuf, la PG est du L- α -phosphatidyl-DL-glycérol transestérifié à partir de la PC de jaune d'œuf et le cholestérol est préalablement

recristallisé dans du méthanol. Tous ces constituants sont des produits commerciaux de chez Sigma-Aldrich.

b) Les ancres fonctionnalisées et dimannosylées

Les ancres fonctionnalisées ont été développées au laboratoire dans le but de fixer des épitopes peptidiques comportant une fonction thiol. L'ancre DiPalmitoyl-Glycerol-Maléimide (DPG-Mal) utilisée dans nos liposomes est préalablement insérée dans la bicouche du liposome avant de réagir chimiquement avec les composés-SH. La synthèse de cette ancre a été effectuée au laboratoire par le Docteur Thomann.^[192]

Afin de concevoir des liposomes capables de cibler les DCs, l'ancre dimannosylée a été synthétisée au laboratoire par le Docteur Espuelas et utilisée dans nos travaux.^[172]

Ces ancres sont représentées sur la figure 4.

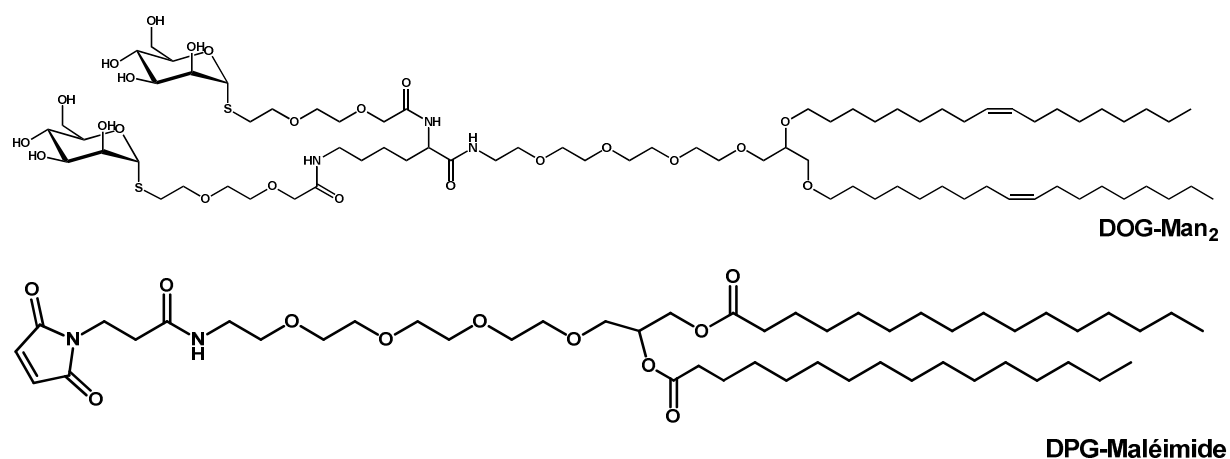


Figure 4 : Ancres Dimannosylée (DOG-Man₂) et DPG-Maléimide (DPG-Mal)

c) Les molécules adjuvantes

La molécule utilisée pour stimuler les DCs et les cellules NKTs est le KRN7000, qui fait partie de la famille des α -GalCer. C'est une molécule qui a été initialement synthétisée au laboratoire par le Docteur Thomann et qui est notre ligand de référence du CD1d des DCs et du TCR des cellules NKTs. Les ancres Pam₂CysAlaGly et Pam₃CysAlaGly ont été également synthétisées au laboratoire par le Docteur Thomann.^[188] Ce sont des ligands des TLRs et plus particulièrement des TLR2/6 pour le Pam₂ et TLR2/1 pour le Pam₃.

Toutes ces molécules adjuvantes sont représentées sur la figure 5.

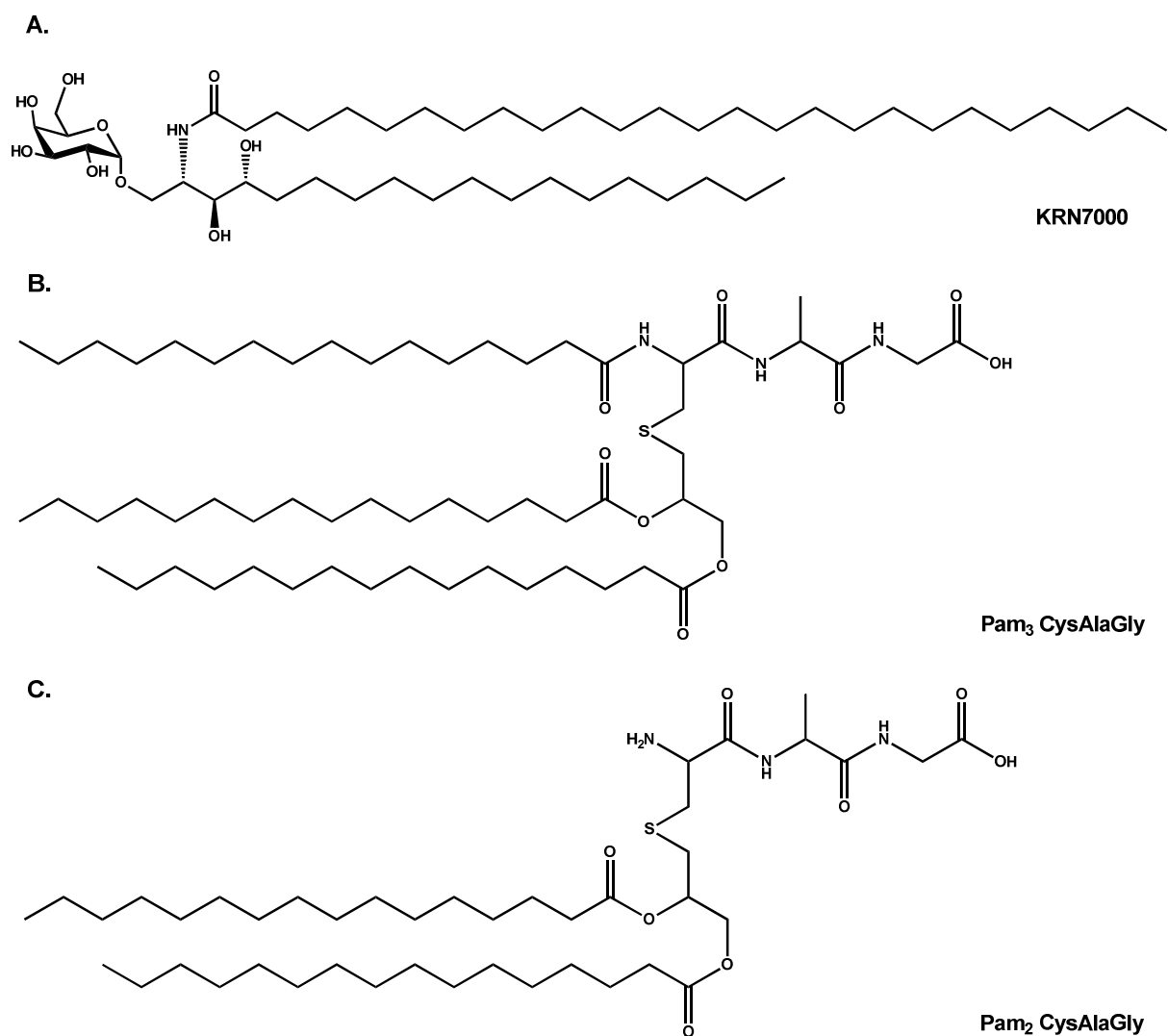


Figure 5 : Schéma du A. KRN7000, B. Pam₃CysAlaGly et du C. Pam₂CysAlaGly.

2) Protocoles de fabrication des différentes formulations

a) Liposomes SUV-KRN-PEG₂₀₀₀

Ces liposomes sont constitués de PC/PG/Chol et de l'adjuvant KRN7000, ainsi que de la molécule de furtivité DiPalmytoyl-Phosphatidyl-Ethanolamine-PEG₂₀₀₀ (Avanti Polar ; DPPE-PEG₂₀₀₀), suivant la répartition présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Constituants des liposomes SUV-KRN-PEG₂₀₀₀.

Constituants	Rapport molaire	Concentration en μmole / ml de préparation liposomique
PC	80	0,8
PG	20	0,2
Cholestérol	50	0,5
KRN7000	11,6	0,116 (100 μg)
DPPE-PEG ₂₀₀₀	0 à 5	0 à 0,05

Ces liposomes ont été formulés suivant le protocole développé par Papahadjopoulos *et al.*^[170]

Les différents constituants sont mis dans un tube en verre, dans un mélange chloroforme/méthanol (9/1). Après évaporation des solvants, le film lipidique obtenu est séché sous vide, au rotavapor pendant 45 minutes. Il est réhydraté par 1 ml de tampon HEPES 10 mM, NaCl 145 mM à pH 7,4, et mélangé vigoureusement. La suspension aqueuse obtenue contenant des MLV est soniquée sous argon pendant 45 minutes à l'aide d'un sonificateur comportant une sonde en titane de 3 mm de diamètre (Vibra cells, Sonic and Materials Inc, Danubary, CT, USA), réglé en mode pulsé avec interruption de 2 s toutes les 1 s afin d'obtenir une population homogène de liposomes de type SUV. La préparation liposomique est ensuite centrifugée pendant 10 min à 10 000 g pour éliminer les particules de titane provenant de la sonde et les éventuels agrégats phospholipidiques. La concentration en phosphatidylcholine est déterminée par dosage de la choline et la taille des particules est déterminée à l'aide de l'analyseur de particules Nano-Sizer.

Une fois les populations obtenues, 50 mg de glucose/ml de liposome sont ajoutés aux formulations comme cryoprotecteur afin de pouvoir congeler les liposomes dans de l'azote liquide, avant de les stocker à -80°C pour une utilisation ultérieure.

b) Liposomes REV-KRN-PEG₂₀₀₀

Les REV sont constitués de PC/PG/Chol et de l'adjuvant KRN7000, ainsi que de la molécule de furtivité DPPE-PEG₂₀₀₀, suivant la répartition présentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Constituants des liposomes REV-KRN-PEG₂₀₀₀.

Constituants	Rapport molaire	Concentration en µmole / ml de préparation liposomique
PC	80	0,8
PG	20	0,2
Cholestérol	50	0,5
KRN7000	11,6	0,116 (100 µg)
DPPE-PEG ₂₀₀₀	0 à 5	0 à 0,05

Les REV sont formulés suivant la méthode décrite par Szoka et Papahadjopoulos.^[166] Le mélange des constituants est mis dans un tube en verre, en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (9/1). Après évaporation des solvants, le film lipidique obtenu est séché sous vide, au rotavapor pendant 45 minutes. On ajoute ensuite 1 ml d'éther et 330 µl de tampon HEPES 10 mM, NaCl 145 mM à pH 7,4. Le mélange est émulsionné à la sonde par l'ultra-sonificateur (Vibra cells, Sonic and Materials Inc (Danubary, CT, USA)), réglé en mode pulsé avec interruption de 2 s toutes les 1 s. 4 cycles de 10 impulsions sont nécessaires pour émulsionner le milieu. Le milieu est mis au rotavapor pour une évaporation contrôlée de l'éther, ce qui va permettre de former les vésicules REV. Une fois les REVs obtenus, la solution est complétée par 660 µl de tampon HEPES 10 mM, NaCl 145 mM pH 7,4. 20 min de vide partiel sont nécessaires pour évaporer les dernières traces d'éther éventuelles. La concentration en phosphatidylcholine est déterminée par dosage de la choline et la taille des particules est déterminée à l'aide de l'analyseur de particules Nano ZS.

Les REV étant sensibles à la congélation, ils doivent être utilisés dans les 5 jours après leur fabrication.

c) Liposomes SUV-KRN-Dimannose

Ces liposomes sont constitués de PC/PG/Chol et de l'adjuvant KRN7000, ainsi que de la molécule de ciblage DOG-Man₂ (Dimannose), suivant la répartition présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Constituants des liposomes SUV-KRN-DiMannose.

Constituants	Rapport molaire	Concentration en µmole / ml de préparation liposomique
PC	80	0,8
PG	20	0,2
Cholestérol	50	0,5
KRN7000	11,6	0,116 (100 µg)
Dimannose	0 à 3	0 à 0,03

Les différents constituants sont mis dans un tube en verre, dans un mélange chloroforme/méthanol (9/1). Après évaporation des solvants, le film lipidique obtenu est séché sous vide, au rotavapor pendant 45 minutes. Il est réhydraté par 1 ml de tampon HEPES 10 mM, NaCl 145 mM à pH 7,4. La suspension aqueuse obtenue est soniquée sous argon pendant 45 minutes pour obtenir des liposomes de type SUV. La préparation liposomique est centrifugée pendant 10 min à 10 000 g.

50 mg de glucose/ml de liposome sont ajoutés aux formulations comme cryoprotecteur, afin de pouvoir congeler les liposomes dans de l'azote liquide, avant de les stocker à -80°C pour une utilisation ultérieure.

d) Liposomes SUV-KRN Fab'

Ces liposomes sont constitués de PC/PG/Chol, de l'adjuvant KRN7000 et de l'ancre fonctionnalisée DPG-Maléimide, qui va permettre de greffer les fragments d'anticorps Fab' non relevant ou Fab' anti-CD11c, sur la surface du liposome. La répartition des constituants du liposome est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Constituants des liposomes SUV-KRN Fab' non relevant et anti-CD11c.

Constituants	Rapport molaire	Concentration en $\mu\text{mole} / \text{ml}$ de préparation liposomique
PC	65	4,2
PG	30	1,9
Cholestérol	50	3,2
KRN7000	0,018	0,0011 (1 μg)
DPG-Maléimide	5	0,3
Fab' non relevant	5.10^{-3}	$3,2.10^{-4}$
Fab' anti-CD11c	2.10^{-2}	$1,3.10^{-3}$

La formulation des liposomes Fab' est basée sur le protocole présenté par Dufresne *et al.*^[189] Après évaporation des solvants au rotavapor, le film lipidique est séché sous vide puis réhydraté par 1 ml de tampon acétate de sodium 100 mM, NaCl 88 mM, EDTA 1 mM à pH 6,5. La suspension aqueuse obtenue est soniquée sous argon pendant 45 minutes pour obtenir des liposomes de type SUV, puis centrifugée pour éliminer les agrégats.

Le greffage du fragment Fab' se fait sur l'ancre DPG-Mal présente dans la bicouche du liposome, à 4°C pendant une nuit sous agitation et sous argon. Le milieu est récupéré et passé sur colonne Sephadex G100 pour séparer les liposomes des fragments qui n'ont pas réagi. Nous récupérons des fractions de 1 ml et un dosage BCA permet d'identifier les fractions contenant nos formulations. Les tubes identifiés sont mélangés, et le milieu est concentré en utilisant un Centricon YM-100 pendant 30 min à 4°C et à 1000g. Le volume est ajusté à 1 ml par du tampon acétate de sodium 100 mM, NaCl 88 mM, EDTA 1 mM à pH 7,4. Le dosage BCA permet de connaître le taux de couplage de nos fragments.

50 mg de glucose/ml de liposomes sont ajoutés aux formulations comme cryoprotecteur afin de pouvoir congeler les liposomes dans de l'azote liquide et les stocker à -80°C pour une utilisation ultérieure.

e) Liposomes SUV-OVA

Ces liposomes sont constitués de PC/PG/Chol, de l'adjuvant KRN7000 et de l'ancre fonctionnalisée DPG-Maléimide, qui va permettre de greffer le peptide OVA sur la surface du liposome. La répartition des constituants du liposome est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Constituants des liposomes SUV-KRN peptide OVA.

Constituants	Rapport molaire	Concentration en $\mu\text{mole} / \text{ml}$ de préparation liposomique
PC	65	3,9
PG	30	1,8
Cholestérol	50	3
KRN7000	0,018	0,0011 (1 μg)
DPG-Maléimide	5	0,3
Peptide OVA	1,6	0,1

Le protocole de fabrication des liposomes avec PC/PG/Chol/KRN/DPG-Mal est identique aux autres liposomes SUVs. Le tampon utilisé est constitué d'HEPES 10 mM, Sorbitol 5% (p/v), pH 6,5.

Le protocole présenté est celui des peptides et liposomes OVA. Dans des eppendorfs de 2 mL, sont mis 400 μl (0,44 μmole) de peptides C-OVA ou OVA-C issus d'une solution stock à 1 $\mu\text{mol/ml}$. En présence de 31 μl (0,31 μmole) de TCEP par tube eppendorf, le milieu est laissé à température ambiante pendant 15 min sous argon, en mélangeant de temps en temps. Après cela, on rajoute nos liposomes et on laisse en contact le tout pendant 2 h à température ambiante et sous argon. On ajoute 45 μl (4,5 μmoles) de β -mercaptoéthanolamine dans chaque tube eppendorf. Après 30 minutes à température ambiante et sous argon, les différentes populations sont dialysées une nuit à 4°C (boudins de dialyse MWCO 12000-14000 Da) contre du tampon HEPES 10 mM, Sorbitol 5% à pH 7,4. Les différentes populations sont récupérées et un dosage à la fluorescamine est effectué.

50 mg de glucose/ml de liposome sont ajoutés aux formulations comme cryoprotecteur afin de pouvoir congeler les liposomes dans de l'azote liquide et les stocker à -80°C pour une utilisation ultérieure.

F) Protocoles des tests in vitro et in vivo

Ces tests ont été mis au point et effectués au sein du laboratoire du Docteur François Trottein de l'Institut Pasteur de Lille.

II) Partie expérimentale chimique

A) Généralités

1) Solvants et réactifs

Les solvants utilisés en synthèse ont été pris au grade analytique. Pour les réactions réalisées dans les conditions anhydres, le dichlorométhane (CH_2Cl_2) est obtenu par distillation sous argon en présence de CaH_2 . Les autres solvants anhydres (tétrahydrofurane (THF), toluène, méthanol (MeOH), diméthylformamide (DMF)) ont été commandés directement chez Acros.

Les réactifs ont été commandés principalement chez Sigma, Acros et Alfa Aesar, Ils ont été utilisés sans purifications supplémentaires.

2) Mesures physiques

a) Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse basse résolution a été effectuée sur une Agilent MSD couplé à une HPLC Agilent 1200 SL.

La spectrométrie haute résolution a été effectuée sur une Agilent 6520 Q-TOF couplée à une HPLC Agilent 1200 SL.

b) RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont obtenus à température ambiante ou à 75°C , sur des spectromètres Bruker Advance 300 ou 400, à une fréquence de 300 ou 400 MHz pour le proton et 75 ou 100 MHz pour le carbone13. Les spectres RMN 2D sont obtenus sur le spectromètre Bruker Advance 400. Les solvants deutérés utilisés sont identifiés grâce au déplacement chimique (δ) du noyau de deutérium. Ces déplacements sont exprimés en ppm (partie par million) et sont propres au solvant utilisé :

Noyau	Solvant	Référence	Déplacement chimique (ppm)
H^1	$CDCl_3$	$CHCl_3$	7,26
	CD_3OD	CD_2HOD	3,31
	C_5D_5N (pyridine)	C_5D_4HN	7,58 (pic du milieu)
	C_6D_6	C_6D_5H	7,16 (75°C)
C^{13}	$CDCl_3$	$CDCl_3$	77,23
	CD_3OD	CD_3OD	49
	C_5D_5N	C_5D_5N	135,6

Pour caractériser la multiplicité du couplage J (exprimé en Hz), les abréviations suivantes sont utilisées : s = singulet ; d = doublet ; t = triplet ; q = quadruplet ; dd = doublet dédoublé ; m = multiplet.

3) Techniques chromatographiques

a) Chromatographie sur couche mince

Les chromatographies sur couches minces sont effectuées sur des plaques de silice MERCK (0,25 mm, Kieselgel 60 F₂₅₄, 20-60 µm). Les plaques sont révélées par illumination à l'aide d'une lampe UV à 320 nm, contact de la plaque avec des vapeurs d'iode et par pulvérisation d'un révélateur approprié suivi d'un chauffage à 200°C.

Les fonctions amines sont révélées à la Ninhydrine, les fonctions thiol et les sucres, nous sont révélées respectivement par le réactif d'Ellman (pas de chauffage pour cette révélation) et une solution d'α-Naphtol. Enfin, l'acide phosphomolybdique a été utilisé comme révélateur de produit lipophiles et divers alcool ou aldéhydes.

b) Chromatographie sur colonne

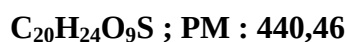
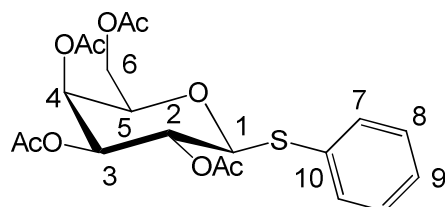
La purification des produits de synthèse par chromatographie sur colonne à faible pression a été effectuée en utilisant de la silice MERCK de type Kieselgel 60, 40-60 µm. La silice est généralement utilisée entre 50 à 100 fois en excès par rapport à la quantité en masse

du produit à purifier. Le diamètre de la colonne est choisi pour que le gel de silice occupe une hauteur d'environ 20 cm. Le débit optimal est de l'ordre de 5 cm par minute pour le front de solvant au-dessus de l'adsorbant. Le solvant d'élution utilisé est précisé pour chaque purification.

B) Synthèses du KRN 7000 et de ses analogues

1) Préparation des synthons glycosidiques

Synthèse du 1-thiophényl-2,3,5,6-tetra-O-acétyl- β -D-galactopyranoside (1)



Du β -D-galactose peracétylé (10 g ; 25,6 mmoles) est dissous dans du benzène (120 ml). La solution est agitée sous argon et du thiophénol (6,1 ml ; 59,9 mmoles) ainsi qu'une solution de tétra chlorure d'étain (SnCl₄) (25 ml ; 25 mmoles ; 1 M dans CH₂Cl₂) sont additionnés. Après 2 heures d'agitation sous reflux, la réaction est traitée par addition d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium (NH₄Cl). Le mélange est extrait par du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium (MgSO₄), filtrées et concentrées. Le produit est purifié sur colonne de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3 à 6/4) pour donner le produit 1 sous forme d'une huile (Masse : 10g ; Rendement : 89 %).

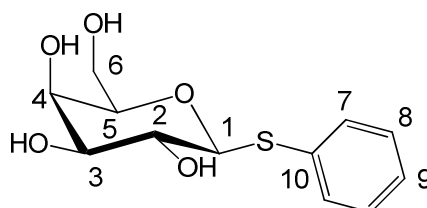
CCM : R_f = 0,5 (cyclohexane/acétate d'éthyle (3/2))

RMN ¹H : (400 MHz ; CDCl₃) : δ : 1,98 ; 2,01 ; 2,06 ; 2,09 (4s ; 12H (4xCOCH₃)) ; 3,92 (t ; H5 ; J=7 Hz) ; 4,07 (2dd ; 2H6 ; J=11,2 Hz ; J=6 Hz et J=11,2 Hz ; J=7 Hz) ; 4,7 (d ; H1 ;

J=10 Hz) ; 5,03 (dd ; H3 ; J=10 Hz ; J=3,3 Hz) ; 5,21 (t ; H2 ; J=10 Hz) ; 5,39 (dd ; H4 ; J=3,3 Hz ; J<1 Hz) ; 7,28 (m ; 3Haro) ; 7,49 (m ; 2Haro)

RMN ^{13}C (100 MHz ; CDCl_3) : δ : 20,62 ; 20,68 ; 20,70 ; 20,89 (4xCOCH₃) ; 61,68 (C6) ; 67,30 (C5) ; 72,04 (C4) ; 74,47 (C2) ; 77,36 (C3) ; 86,60 (C1) ; 128,19 ; 128,93 (C9 ; 2C7 ; 2C8) ; 132,59 (C10) ; 170,05 ; 170,21 ; 170,38 (4xCOCH₃)

Synthèse du 1-thiophényl - β -D-galactopyranoside (2)



C₁₂H₁₆O₅S ; PM : 272,37

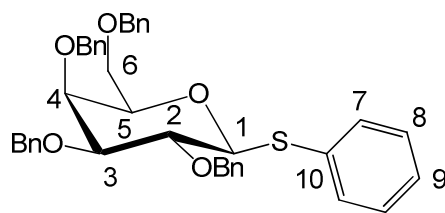
Le produit 1 (10 g ; 22,9 mmoles) est dissout dans du méthanol (250 ml), du méthanolate de sodium est ajouté au milieu réactionnel jusqu'à pH= 9-10. Après 1 heure sous agitation et à température ambiante, la réaction est traitée par ajout d'amberlite IR120 jusqu'à pH=7. Le mélange est filtré. Le filtrat récupéré est évaporé à sec. Le produit 2 est suffisamment pur pour être directement utilisé pour la prochaine réaction (Masse : 5,8 g ; Rendement : 93 %). Le produit 2 est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

CCM : R_f =0,25 (CH_2Cl_2 / MeOH (9/1))

RMN ^1H : (400 MHz ; CD_3OD) : δ : 3,44–3,74 (m ; 5H (2H6, H5, H3, H2)) ; 3,86 (dd ; H4 ; J=3,2 Hz ; J<1 Hz) ; 4,55 (d ; H1 ; J=9,8 Hz) ; 7,16 (m ; 3Haro) ; 7,50 (m ; 2Haro)

RMN ^{13}C (100 MHz ; CD_3OD) : δ : 62,65 (C6) ; 70,46 (C4) ; 71,05 (C2) ; 76,37 (C3) ; 80,64 (C5) ; 90,32 (C1) ; 128,04 ; 128,89 ; 132,13 (C9 ; 2C7 ; 2C8) ; 136,11 (C10)

Synthèse du 1-thiophényl-2,3,5,6-tetra-O-benzyl - β -D-galactopyranoside (3)



C₄₀H₄₀O₅S; PM : 632,81

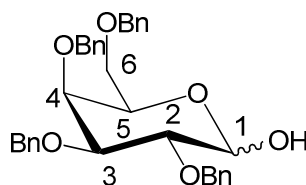
Le produit 2 (3,1 g ; 11,38 mmoles) est dissous dans 150 ml de DMF anhydre. Une suspension de NaH 60% (2,5 g ; 62,5 mmoles) est ajoutée à 0°C. Après agitation pendant 15 minutes à température ambiante, du bromure de benzyle (BnBr) (8,5 ml ; 71 mmoles) est additionné goutte à goutte au milieu réactionnel contenant l'alcoolate formé. Du KI (100 mg ; 0,6 mmole) est également ajouté en quantité catalytique. Après 2 heures sous agitation, on ajoute 100 ml d'H₂O glacée au milieu réactionnel afin de consommer l'excès de NaH. La phase organique est extraite avec du diéthyle éther (éther) (3 x 150 ml) puis lavée successivement avec 2 fois 100 ml d'une solution de HCl 1N, 2 fois avec 100 ml d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃) et une fois avec 100 ml de saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (9,5/0,5 à 9/1). Le produit 3 est obtenu sous forme d'une huile visqueuse (Masse : 5,8 g ; Rendement : 80%).

CCM : R_f = 0,3 (cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 3,58-3,68 (m ; 4H(2H6, H3, H5)) ; 3,97 (t ; J_{H2-H1}=9Hz ; H2) ; 4,02 (dd ; J=2,9 Hz ; J<1 Hz ; H4) ; 4,43-4,52 (2dd ; J=11,5 Hz ; 2H (CH₂-Phe)) ; 4,63 (d ; J=11,5 Hz ; 1H(CH₂-Phe)) ; 4,68 (d ; J=9,7 Hz ; H1) ; 4,80 (m ; J=11,5 Hz ; 4H(2xCH₂-Phe)) ; 5,02 (d ; J=11,5 Hz ; 1H(CH₂-Phe)) ; 7,21-7,61 (3m ; 25Haro)

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) : 69,4 (C6) ; 73,4 ; 74,2 ; 75,1 ; 76,3 ; (4xCH₂-Phe ; C5) ; 77,93 (C4 ; C2) ; 84,8 (C3) ; 88,35 (C1) ; 127,7-129,6 (23Caro) ; 132,1 (2C8) ; 134,8 (C10) ; 138.51 ; 138,89 ; 138,97 ; 139,41 (4C_qaro)

Synthèse du 2,3,5,6-tetra-O-benzyl -D-galactopyranoside (4)



C₃₄H₃₆O₆ ; PM : 540,65

Le produit 3 (5,7 g ; 9 mmoles) est dissous dans de l'acétone (55 ml) auquel on ajoute de l'eau distillée (6 ml) et du N bromosuccinimide (2,8 g ; 19 mmoles). Après 15 minutes sous agitation, du NaHCO₃ (12,5 g) en poudre, est ajouté au milieu. Après 5 minutes d'agitation, le solvant est évaporé et le mélange réactionnel est repris dans de l'acétate d'éthyle (100 ml) et une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (100 ml). Le produit est extrait par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2 à 7/3). Le produit 4 est obtenu sous forme d'un mélange huileux (Masse : 4,8 g ; Rendement : 99%).

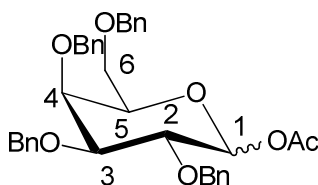
CCM : R_f = 0,3 (cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3))

Mélange α et β (Ratio α/β : 7 / 3) : La proportion d'anomère α et β a été estimée par intégration du proton H1 α (δ : 5,33)

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 3,33 (brs ; OH) ; 3,55-3,68 (m ; 3H(2H₆, H₃)) ; 3,9-4,2 (m ; 3H(H₄, H₅, H₂)) ; 4,4-5,0 (8d ; 8H(4xC_{H₂}-Phe)) ; 5,33 (d ; J=3,32 Hz ; H1 α) ; 7,2-7,5 (m ; 20H_{aro})

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) : 69,4 ; 69,5 ; 69,6 ; 73,2 ; 73,7 ; 73,9 ; 74,9 ; 75,1 ; 75,4 ; 79,1 ; 82 ; 82,5 ; 92,2 (C1 α) ; 98,1 (C1 β) ; 127,8-128,7 (20C_{aro}) ; 138,1 ; 138,6 ; 138,9 (4C_q_{aro})

Synthèse du 1-acétyl-2,3,5,6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranoside (5)



C₃₆H₃₈O₇ ; PM : 582,68

Le produit 4 (3,2 g ; 5,92 mmoles) est dissous dans du CH₂Cl₂ (30 ml) en présence de pyridine (1,38 ml ; 17,8 mmoles). Sous argon et agitation, de l'anhydride acétique (2 ml ; 17,76 mmoles) est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. Après avoir ajouté de la diméthyl-amino-pyridine (DMAP) (50 mg ; 0,4 mmole), la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 12 heures.

Le milieu est traité par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite par du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées. Le produit brut est purifié sur colonne de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2). Le produit 5 est obtenu sous forme de mélange d'anomères de nature huileuse (Masse : 3,3 g ; Rendement : 95%).

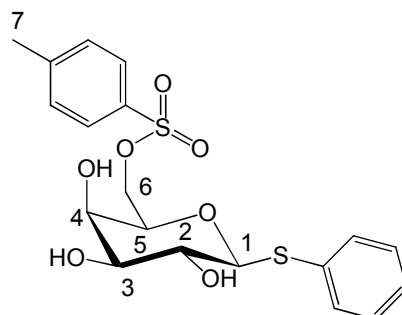
CCM : R_f = 0,3 (cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2))

Mélange α et β (Ratio α/β : 1/1) : La proportion d'anomère α et β a été estimée par intégration du proton H1 α (δ : 6,43) et H1 β (δ : 5,63)

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : 2,08 (s ; 3H(COCH₃ β)) ; 2,16 (s ; 3H(COCH₃ α)) ; 3,5-5 (m ; 14H) ; 5,63 (d ; J=8 Hz ; H1 β) ; 6,43 (d ; J=3,6 Hz ; H1 α) ; 7,35 (m ; 20Haro)

HMRS : 605,2525 [M + Na]⁺ ; masse théorique : 605,2510 g.mol⁻¹ [M + Na]⁺

Synthèse du 1-thiophenyl-6-O-p-toluenesulfonyl-β-D-galactopyranoside (6)



C₁₉H₂₂O₇S₂ ; PM : 426,5

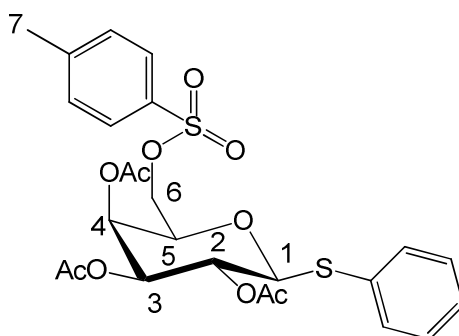
Le produit 2 (5,8 g ; 21,2 mmoles) est dissous dans de la pyridine (50 ml). Du para-chloro-tosylate (4,4 g ; 23,3 mmoles) est ajouté au milieu réactionnel à -45°C. La température est remontée doucement jusqu'à température ambiante et après 6 heures sous agitation, du MeOH (15 ml) est ajouté. La réaction est agitée pendant 1 heure, puis la pyridine est évaporée sous pression réduite par une distillation azéotropique avec du toluène. Le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant acétate d'éthyle/cyclohexane/MeOH (2/2/0,5). Le produit 6 est obtenu sous la forme d'un solide blanc (Masse : 5,4 g ; Rendement : 60%).

CCM : R_f = 0,5 (acétate d'éthyle/cyclohexane/MeOH (2/2/0,5))

RMN ¹H : (300 MHz ; CD₃OD) : δ : 2,42 (s ; 3H₇) ; 3,48 (dd ; H₃ ; J=9 Hz ; J=3,5 Hz) ; 3,57 (t ; H₂ ; J=9,4 Hz) ; 3,79 (m ; H₅) ; 3,83 (dd ; H₄ ; J=3,3 Hz ; J=1 Hz) ; 4,20 (m ; 2H₆) ; 4,55 (d ; H₁ ; J=9,5 Hz) ; 7,25 (m ; 7H_{aro}) ; 7,52 (m ; 2H_{aro})

RMN ¹³C (100 MHz ; CD₃OD) : δ : 21,62 (C₇) ; 70,30 (C₆) ; 70,71 (C₄) ; 71,24 (C₂) ; 75,89 (C₃) ; 77,45 (C₅) ; 89,64 (C₁) ; 128,07 ; 129,11 ; 129,91 ; 131,10 ; 132,07 (9Caro) ; 134,21 (Caro) ; 135,84 (Caro) ; 146,55 (Caro)

Synthèse du 1-thiophenyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-p-toluenesulfonyl-β-D-galactopyranoside (7)



C₂₅H₂₈O₁₀S₂ ; PM : 552,51

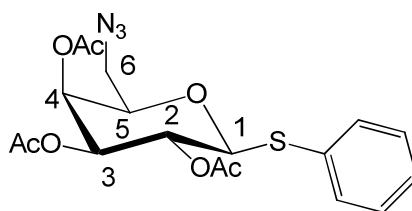
Le produit 6 (1,8 g ; 4,2 mmoles) est dissous dans de la pyridine (20 ml) et dans de l'anhydride acétique (20 ml). Le milieu est mis sous agitation et sous argon pendant 12 heures. On ajoute du toluène et le milieu est évaporé à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (3/1). Le produit 7 est obtenu sous la forme d'un solide blanc (Masse : 2,1 g ; Rendement 92%).

CCM : R_f = 0,45 (cyclohexane/acétate d'éthyle/MeOH (3/1/0,5))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 1,96-2,09 (3s ; 9H (COCH₃)) ; 2,45 (s ; 3H7) ; 3,97 (t ; H5 ; J=6,2 Hz) ; 4,03 (dd ; 1H6 ; J=10,1 Hz ; J=5,7 Hz) ; 4,14 (dd ; 1H6 ; J=10,0 Hz ; J=6,7 Hz) ; 4,70 (d ; H1 ; J=10 Hz) ; 5,02 (dd ; H3 ; J=10,0 Hz ; J=3,2 Hz) ; 5,21 (t ; H2 ; J=10,1 Hz) ; 5,40 (d ; H4 ; J=3,2 Hz) ; 7,30-7,51 (m ; 7Haro) ; 7,75 (m ; 2Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 20,49 ; 20,64 ; 20,82 (3xCOCH₃) ; 21,67 (C7) ; 66,41 (C6) ; 67,04 (C2 ; C4) ; 71,76 (C3) ; 74,21 (C5) ; 86,73 (C1) ; 128,06 ; 128,22 ; 129,00 ; 129,99 ; 132,32 ; 132,44 (10Caro) ; 145,27 (Caro) ; 169,40 ; 169,89 (3xC=OCH₃)

Synthèse du 1-thiophenyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-azido-6-deoxy-β-D-galactopyranoside (8)



C₁₈H₂₁N₃O₇S ; PM : 423,55

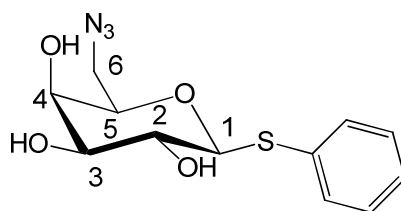
Le produit 7 (2,1 g ; 3,8 mmoles) est dissous dans du DMF (40 ml) contenant de l'azoture de sodium (NaN₃) (2,47 g ; 38 mmoles). Le milieu est chauffé pendant 6 heures à 160°C. La réaction est refroidie à température ambiante. De l'eau glacée (50 ml) est ajoutée. La phase organique est extraite par du CH₂Cl₂ (3 x 200 ml) et séchée sur MgSO₄ puis concentrée. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2). Le produit 8 est obtenu sous la forme d'un solide incolore (Masse : 1,19 g ; Rendement 74%).

CCM : R_f = 0,35 (cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2))

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 1,91-2,02 (3s ; 9H (COCH₃)) ; 3,12 (dd ; 1H₆ ; J=12,9 Hz ; J=4,2 Hz) ; 3,42 (dd ; 1H₆ ; J=12,9 Hz ; J=8,2 Hz) ; 3,77 (m ; H₅) ; 4,69 (d ; H₁ ; J=10,0 Hz) ; 5,00 (dd ; H₃ ; J=10,0 Hz ; J=3,3 Hz) ; 5,16 (t ; H₂ ; J=10,0 Hz) ; 5,29 (d ; H₄ ; J=3,0 Hz) ; 7,22-7,26 (m ; 3H_{aro}) ; 7,44-7,47 (m ; 2H_{aro})

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 20,43 ; 20,67 ; 20,84 (3xCOCH₃) ; 50,77 (C₆) ; 67,15 (C₄) ; 68,03 (C₂) ; 71,89 (C₃) ; 75,79 (C₅) ; 86,47 (C₁) ; 128,10 ; 128,86 ; 132,27 ; 132,63 (6C_{aro}) ; 169,24 ; 169,79 ; 170,04 (3xC=OCH₃)

Synthèse du 1-thiophenyl-6-azido-6-deoxy-β-D-galactopyranoside (9)



C₁₂H₁₅N₃O₄S ; PM : 297,33

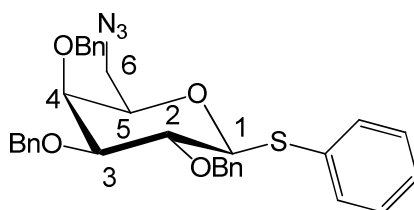
Le produit 8 (1,2 g ; 2,8 mmoles) est dissous dans du méthanol (40 ml). Du méthanolate de sodium est ajouté au milieu jusqu'à pH 9-10. On laisse 1h sous agitation à température ambiante et la réaction est traitée par ajout d'amberlite IR120, jusqu'à pH 7. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat est évaporé à sec. Le produit 9 est obtenu sans purification sous la forme d'un solide blanc (Masse : 680 mg ; Rendement 82%).

CCM : R_f = 0,6 (CH₂Cl₂/MeOH (9/1))

RMN ¹H : (400 MHz ; MeOD) : δ : 3,29 (m ; 1H₆) ; 3,53 (m ; 4H ; H₆ ; H₄ ; H₃ ; H₂) ; 3,82 (m ; H₅) ; 4,62 (d ; H₁ ; J=9,5 Hz) ; 7,24 (m ; 3H_{aro}) ; 7,56 (m ; 2H_{aro})

RMN ¹³C : (100 MHz ; MeOD) : δ : 52,89 (C₆) ; 70,84 ; 70,93 (C₂ ; C₄) ; 76,06 (C₅) ; 78,92 (C₃) ; 90,30 (C₁) ; 128,35 ; 130,00 ; 132,51 ; 135,66 (6Caro)

Synthèse du 1-thiophényl-2,3,4-tri-O-benzyl -6-azido-6-deoxy-β-D-galactopyranose (10)



C₃₃H₃₃N₃O₄S ; PM : 567,70

Le produit 9 (680 mg ; 2,28 mmoles) est dissous dans de la DMF (20 ml). Une suspension de NaH 60% (408 mg ; 10,5 mmoles) est ajoutée au milieu réactionnel préalablement mis à 0°C. Après agitation pendant 15 minutes à température ambiante, du BnBr (1,64 ml ; 13,68 mmoles) est additionné goutte à goutte au milieu réactionnel contenant l'alcoolate formé. Du KI (10 mg) est également ajouté en quantité catalytique. Après 6 heures d'agitation, on ajoute 30 ml d'H₂O glacée au milieu afin de consommer l'excès de NaH. La phase organique est ensuite extraite avec 3 x 50 ml d'éther, puis lavée successivement avec 2 x 30 ml d'HCl 1N, 2 x 30 ml de NaHCO₃ saturé et 30 ml de saumure. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5 à 9/1). Le produit 10 est obtenu sous forme d'un solide blanc (Masse : 1,02 g ; Rendement : 64%).

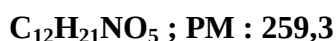
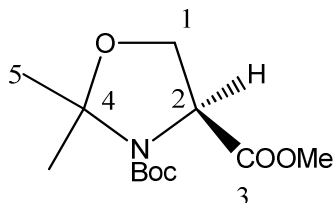
CCM : R_f = 0,3 (cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 3,19 (dd; 1H₆ ; J=12,2 Hz ; J=5,9 Hz) ; 3,48 (t ; H₅ ; J=6,2 Hz) ; 3,61 (m ; 2H ; H₆ ; H₃) ; 3,83 (d ; H₄ ; J=2,7 Hz) ; 3,99 (t ; H₂ ; J=9,4 Hz) ; 4,67 (m ; 2H ; H₁ ; 1CH₂Phe) ; 4,85 (m ; 4H ; 2CH₂Phe) ; 5,07 (d ; 1H ; CH₂Phe) ; 7,25 (m ; 20H_{aro})

RMN ¹³C : (75 MHz ; CDCl₃) : δ : 52,03 (C₆) ; 72,73 (CH₂Phe) ; 74,47 (C₅) ; 75,12 ; 76,36 (2CH₂Phe) ; 77,63 ; 77,80 (C₄ ; C₂) ; 84,76 (C₃) ; 88,65 (C₁) ; 121,77 ; 127,84 ; 128,11 ; 128,33 ; 128,51 ; 128,52 ; 128,78 129,02 ; 129,08 129,24 ; 129,62 (18Caro) ; 132,63 (2Caro) ; 134,53 (C_q aro) ; 138,85 (2C_q aro) ; 139,04 (2C_q aro)

2) Synthèse du synthon céramide

Synthèse du (S)-3-*tert*-butyl 4-méthyl 2,2-diméthylloxazolidine-3,4-dicarboxylate (11)



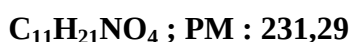
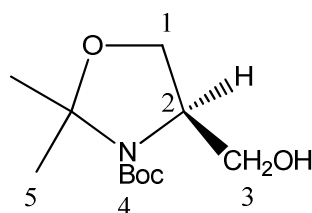
Du Boc-Ser-OMe (9 g ; 0,38 mole) est dissous dans 60 ml de 2,2-diméthoxypropane, plus 100 ml d'acétone. Le milieu est refroidi à 0°C avant d'ajouter très prudemment 300 µl de $BF_3 \cdot Et_2O$. La réaction est laissée sous agitation et sous argon pendant 4 heures. Puis le milieu est concentré à 30 ml et est neutralisé par l'ajout de 100 ml de $NaHCO_3$ saturé. Le produit est extrait par 3 x 100 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique est ensuite lavée avec une solution de saumure, séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée. Le résidu est passé sur colonne de chromatographie sur silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1 à 85/15).

Le produit 11 est obtenu sous la forme d'une huile jaune (Masse : 8,8g ; Rendement 89%).

Rf=0,6 (cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2))

RMN 1H : (300 MHz ; $CDCl_3$, 60°C) : δ : 1,37 (s ; 9H (Boc CH_3)) ; 1,47 ; 1,60 (2s ; 6H ; 2x3H5) ; 3,69 (s ; 3xH3) ; 3,94 ; 4,06 (2dd ; 2xH1) ; 4,32 (m ; H2)

Synthèse du (R)-tert-butyl 4-(hydroxyméthyl)-2,2-diméthylloxazolidine-3-carboxylate (12)

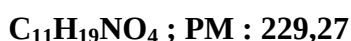
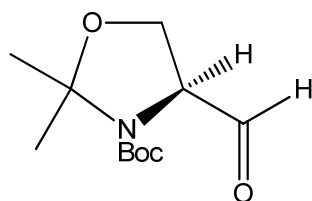


Le produit 11 (8,8 g ; 0,34 mole) est dissous dans 300 ml de THF. En parallèle, du LiAlH₄ (2,5 g ; 0,66 mole) est mis en solution dans 160 ml de THF et est ajouté au produit 11, mis au préalable à 0°C. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et sous argon pendant 2 heures. Après disparition du produit de départ, on ajoute doucement 5 ml d'H₂O glacée. Après 2 minutes, on ajoute 12 ml de NaOH 1N et 12 ml d'H₂O successivement. On laisse sous agitation pendant 1h30, et le sel blanc formé est filtré et lavé avec de l'éther. Le filtrat est récupéré, le solvant évaporé et on obtient le produit 12 sous la forme d'une huile jaune (Masse : 7,7g ; Rendement : 99%).

R_f=0,3 (cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃, 60°C) : δ : 1,45 (s ; 9H4 (Boc CH₃)) ; 1,50 (s ; 6H ; 2x3H5) ; 3,54 (m ; 1H ; OH) ; 3,69(m ; 2H ; 2xH1) ; 3,87 (m ; 3H ; H2, 2xH3)

Synthèse du (S)-tert-butyl 4-formyl-2,2-diméthylloxazolidine-3-carboxylate (aldéhyde de Garner (13))

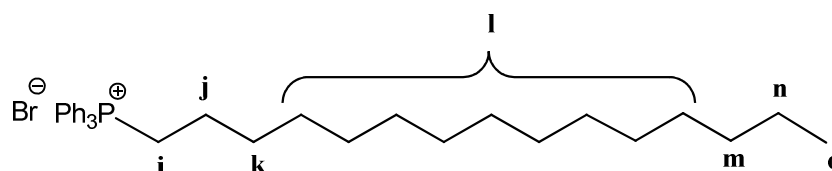


A une solution de chlorure d'oxalyle (450 μ l ; 5,21 mmoles) à -78°C , on ajoute doucement du diméthylsulfoxyde (DMSO) (580 μ l ; 8,16 mmoles) dissous au préalable dans 10 ml de CH_2Cl_2 . Le milieu est agité pendant 5 minutes à -78°C . Puis le produit 12 (900 mg ; 3,9 mmoles), dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 , est ajouté au milieu réactionnel à -78°C . Le milieu est agité pendant 15 minutes, et de la triéthylamine (TEA) (2,2 ml ; 16 mmoles) est ajoutée. On laisse le milieu revenir à température ambiante. On neutralise le milieu avec 50 ml de NaHCO_3 saturé, et on extrait le produit avec 40 ml d'éther. La phase organique est lavée avec 100 ml de KHSO_4 saturé, puis 100 ml de NaHCO_3 saturé, et enfin 80 ml de saumure. La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Le solvant évaporé et le mélange réactionnel est déposé sur colonne de silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (75/25). Le produit 13 est obtenu sous la forme d'une huile jaunâtre (Masse : 1g ; Rendement : 84%).

$R_f=0,4$ (cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2))

RMN ^1H : (300 MHz ; C_6D_6 ; 60°C) : δ : 1,45 (s ; 9H4 (Boc CH_3)) ; 1,50 (s ; 6H ; 2x3H5) ; 3,54 (m ; 1H ; OH) ; 3,69(m ; 2H ; 2xH1) ; 3,87 (m ; 3H ; H2, 2xH3)

Synthèse du Bromure de Pentadecyltriphenylphosphonium (14)



$\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{BrP}$; PM : 553,6

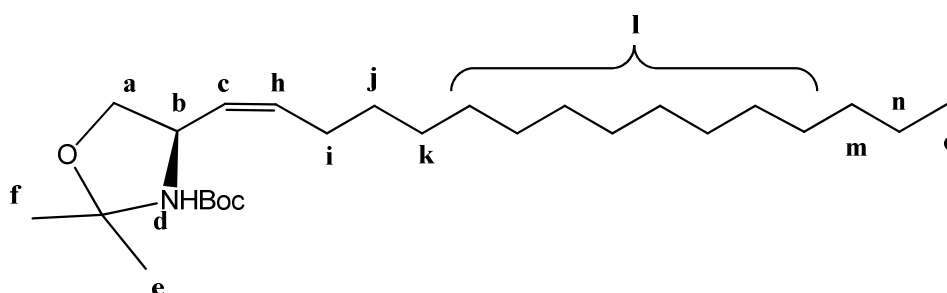
Du bromo-pentadecane (9,6 g ; 0,33 mole) et de la triphénylphosphine (PPh_3) (8 g ; 0,30 mole) sont mis en solution dans 200 ml de toluène. Le milieu est chauffé à reflux pendant 5 jours, sous argon. Le toluène est évaporé et l'huile obtenue est lavée avec un mélange cyclohexane/éther (1/1). La pâte obtenue est filtrée, puis relavée jusqu'à disparition des restes des produits non réactifs, par un mélange cyclohexane/éther (1/1) (3 lavages). Le solide blanc obtenu est dissous dans du CH_2Cl_2 , évaporé à sec et redissous dans l'éther. Le milieu est concentré à sec et l'on obtient une poudre blanchâtre (Masse : 11 g ; Rendement 60%).

CCM : R_f = 0 (cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1))

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,85 (t ; 3xH_o) ; 1,16 ; 1,22 (2s ; 22H ; 2H_m, 2H_n, 18H_l) ; 1,59 (m ; 4H ; 2H_k, 2H_j) ; 3,69 (m ; 2H_i) ; 7,68 (m ; 15H_{aro})

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,1 (C_o) ; 22,66 ; 23,10 (C_i, C_j) ; 29,18 ; 29,32 ; 29,51 ; 30,35 (9xCl, C_m, C_k) ; 31,89 (C_n) ; 117,95 ; 118,80 (3C_{qua}) ; 130,44 ; 133,61 ; 135,01 (15xC_{aro})

Synthèse du (R,Z)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1,2-O,*N*-isopropylideneoctadec-3-en-1-ol (15)



C₂₆H₄₉NO₃ ; PM : 423,67

A une solution d'hexamethyldisylazane (HMDS) (2,98 ml ; 14,07 mmoles) dissous dans 25 ml de THF anhydre, est ajoutée doucement à température ambiante et sous argon, du n-butyllithium (n-BuLi) 1,6M dans de l'hexane (8,7 ml ; 14,07 mmoles). Le milieu est agité pendant 5 minutes, puis le produit 14 (7,47 g ; 13,05 mmoles) dissous dans 30 ml de THF anhydre, est ajouté. Le milieu est agité pendant 20 minutes. La solution rouge résultante est canulée dans un ballon à -78°C contenant l'aldéhyde de Garner (produit 3) (1,5 g ; 6,7 mmoles) dissous dans 20 ml de THF anhydre. Après 1h30 d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est neutralisé avec 40 ml d'H₂O glacée et 40 ml d'HCl 0,1N.

Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO₄ et concentrée. Le mélange est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (40/1 à 20/1) pour donner un mélange d'isomère Z (majoritaire) et d'isomère E avec un ratio de (9/1). Le mélange est alors purifié sur colonne de

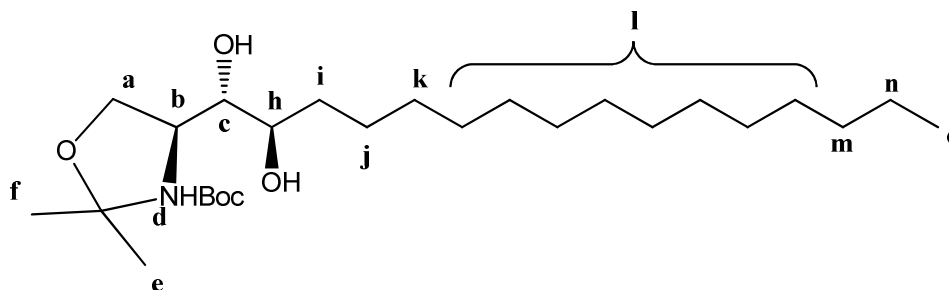
silice avec comme éluant du toluène pour obtenir l'isomère Z sous forme d'une huile incolore (Masse : 1,8 g, Rendement 43%).

CCM : R_f = 0,35 (cyclohexane/acétate d'éthyle (20/1))

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,82 (t ; J=7,2 Hz ; 3H_o) ; 1,22 (m ; 24H(2H_n, 2H_m, 16H_l, 2H_k, 2H_j)) ; 1,40 (s ; 9H_d) ; 1,48 ; 1,54 (2s ; 3H_e, 3H_f) ; 2,08 (m ; 2H_i) ; 3,57 (dd ; J=3,3 Hz ; d=8,8 Hz ; 1H_a) ; 3,99 (dd ; J=6,3 Hz ; J=8,8 Hz ; 1H_a) ; 4,55 (m ; H_b) ; 5,36 (d ; J=8,7 Hz ; 2H(H_c, H_h))

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 13,99 (C_o) ; 22,6 (C_n) ; 24,03 ; 26,29 (C_e ; C_f) ; 27,36 (C_i) ; 29,22 (3C_d) ; 29,42 ; 29,52 ; 29,58 ; 29,66 (8C_l ; C_k ; C_j) ; 31,84 (C_m) ; 54,47 (C_b) ; 68,92 (C_a) ; 79,44 (OC(CH₃)₃) ; 93,84 (C_q_{acétale}) ; 130,28 ; 130,56 (C_c ; C_h) ; 151,84 (NC_{CO}tBu)

Synthèse du (2S,3S,4R)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1,2-O,N-iso propylidèneoctadecane-1,3,4-triol (16)



C₂₆H₅₁NO₅ ; PM : 457,69

Une solution de N-Me-Morpholine N-oxide hydrate dans l'eau (1,15 g ; 2 ml d'H₂O) et d'acétone (8,4 ml) est additionnée à une quantité catalytique de tetroxide d'osmium (46 mg ; 0,18 mmole) dissous dans 8,4 ml d'alcool *tert*-butanol (t-BuOH). Après 15 minutes à température ambiante, on ajoute le produit 15 (1,8 g ; 4,25 mmole) dissous dans 4 ml d'acétone. Le milieu réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante. La réaction est ensuite neutralisée avec de l'eau saturée en Na₂S₂O₃ et laissée sous agitation pendant 30 minutes (couleur noire). Le mélange est extrait par de l'acétate d'éthyle.

Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO₄ et concentrées. Le mélange réactionnel est purifié deux fois sur colonne de silice avec un mélange d'éluant

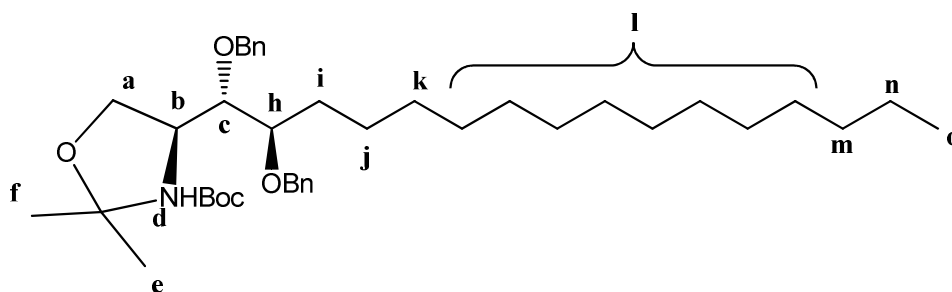
cyclohexane/acétate d'éthyle 3/1 pour la première, et CH₂Cl₂/éther/cyclohexane (7/3/1) pour la deuxième, pour donner l'isomère majoritaire (2S, 3S, 4R) sous forme d'un solide incolore (Masse 900 mg ; Rendement : 47%), et l'isomère minoritaire (2S, 3R, 4S) également sous forme solide (Masse 215 mg ; Rendement : 11%).

CCM : R_f = 0,3 (CH₂Cl₂/éther/cyclohexane (7/3/1)) pour le produit majoritaire

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,84 (t ; J=6,8 Hz ; 3H_o) ; 1,22 (m ; 24H(2H_n, 2H_m, 16H_l, 2H_k, 2H_j)) ; 1,43 (m ; 17H ; 9H_d ; 3H_e, 3H_f ; 2H_i) ; 3,39 (m ; 5H ; H_c ; H_h ; 2H_a ; H_b)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,33 (C_o) ; 22,91 (C_n) ; 26,45 (C_e ; C_f) ; 27,08 (C_j) ; 28,63 (3C_d) ; 29,59 ; 29,89 (C_k ; 8C_l) ; 32,15 (C_m) ; 33,58 (C_i) ; 59,62 (C_b) ; 65,41 (C_a) ; 74,15 (C_h) ; 75,08 (C_c) ; 81,48 (OC(CH₃)₃) ; 94,17 (C_{quat}) ; 154,10 (NCOOtBu)

Synthèse du (2S,3S,4R)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1,2-O,N-iso-propylidène-3,4-bis(benzyloxy)octadecane-1-ol (17)



C₄₀H₆₃NO₅ ; PM : 637,93

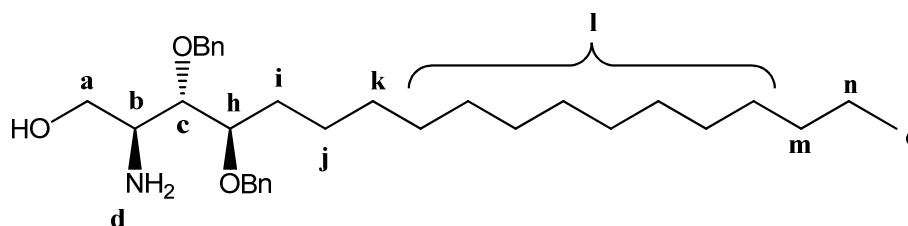
Le produit 16 (100 mg ; 0,22 mmole) et du bromure de benzyloxy (253 µl ; 2,2 mmoles) sont dissous dans 5 ml de DMF. A 0°C on ajoute NaH 60% (22 mg ; 0,55 mmole) et du KI (10 mg ; 0,06 mmole). Le milieu est agité sous argon et à température ambiante pendant 12 heures. Le NaH en excès est alors neutralisé par une solution d'eau glacée (10 ml) puis une solution saturée de NaHCO₃ (20 ml). Le mélange est extrait avec du CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée. Le mélange est purifié sur colonne de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5) pour donner le produit 17 sous forme d'une huile incolore (Masse : 108 mg ; Rendement : 77 %).

CCM : Rf =0,5 (cyclohexane/acétate d'éthyle (19/1))

RMN ^1H : (300 MHz ; CDCl_3) : δ : 0,90 (t ; J=6,7 Hz ; 3Ho) ; 1,26 (m ; 24H(2Hj, 2Hk, 16Hl, 2Hm, 2Hn)) ; 1,45-1,65 (m ; 17H (9Hd, 3He, 3Hf, 2Hi)) ; 3,52 (m ; Hh) ; 3,96 (m ; 1Ha) ; 4,09-4,35 (m ; 3H(1Ha, Hb, Hc)) ; 4,54 (m ; 1H($\underline{\text{CH}_2}$ -Phe)) ; 4,69 (m ; 3H($\underline{\text{CH}_2}$ -Phe)) ; 7,31 (m ; 10Haro)

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) : δ : 14,1 (Co) ; 22,6 (Cn) ; 25,9 (Cj) ; 26,6 (Ce ; Cf) ; 28,5 (3Cd) ; 29,7 ; 29,9 (8Cl ; Ck) ; 31,5 (Ci) ; 31,9 (Cm) ; 57,8 (Cb), 64,2 (Ca) ; 72,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{phe}$) ; 73,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{phe}$) ; 78,8-80,0 (Cc ; Ch ; $\text{O}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$) ; 127,4-128,2 (10Caro) ; 138,7 (2Cqaro) ; 152,7 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$)

Synthèse du (2S,3S,4R)-2-amino-3,4-bis(benzyloxy)octadécane-1-ol (18)



$\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{NO}_3$; PM : 497,75

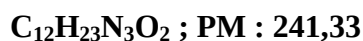
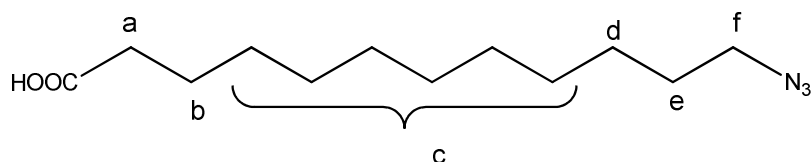
Le produit 17 (108 mg ; 0,17 mmole) est dissous dans 2 ml de d'acide trifluoroacétique (TFA) et 100 μl d' H_2O . Après 30 minutes d'agitation, le mélange est évaporé à sec. Le mélange est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TEA}$ (95/5/1). Le produit 18 est récupéré sous la forme d'une cire blanche (Masse : 85 mg ; Rendement : 99%).

CCM : Rf =0,3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TEA}$ (95/5/1))

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) : δ : 0,88 (t ; 3Ho) ; 1,24-1,34 (m ; 24H(2Hj, 2Hk, 16Hl, 2Hm, 2Hn)) ; 1,58 (m ; 2Hi) ; 3,38 (m ; Hb) ; 3,64-3,90 (m ; 4H(2Ha, Hh, Hc)) ; 4,54 ; 4,58 ; 4,61 ; 4,66 (d ; J=11,2 Hz ; 4H($\underline{\text{CH}_2}$ -Phe)) ; 7,30 (m ; 10Haro)

RMN ^{13}C (100 MHz ; CDCl_3) : δ : 14,26 (Co) ; 22,83 (Cn) ; 25,42 (Cj) ; 29,51 (Ck) ; 29,72 ; 29,82 ; 29,85 ; 29,86 (8Cl) ; 30,62 (Ci) ; 32,07 (Cm) ; 54,65 (Cb), 61,09 (Ca) ; 72,55 ; 73,69 (2x CH_2phe) ; 79,39-80,08 (Cc ; Ch) ; 128,03 ; 128,11 ; 128,15 ; 128,22 ; 128,64 (10Caro) ; 137,71 ; 137,89 (2Cqaro)

Synthèse de l'acide 12-azidododécanoïque (19)



L'acide 12-bromo-dodécanoïque (1 g ; 3,5 mmoles) est dissous dans 5 ml de DMF contenant KOH (196 mg ; 3,5 mmoles) pour obtenir le sel de l'acide 12-bromo-dodécanoïque. Le milieu est laissé sous agitation pendant 20 minutes. On obtient un solide blanc.

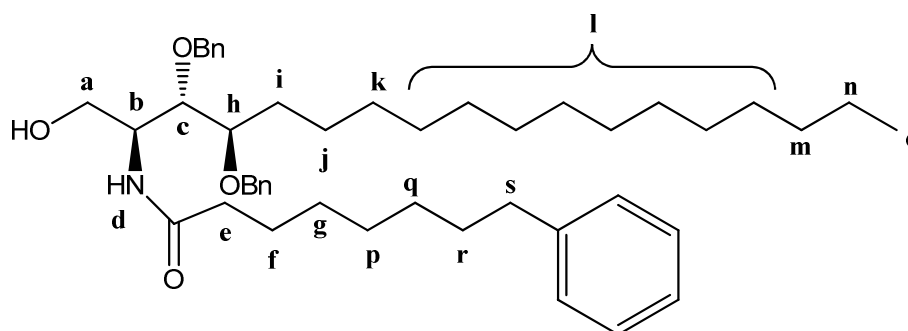
On ajoute du NaN_3 (455 mg ; 7 mmoles) dans le milieu réactionnel. Le milieu est laissé sous agitation et argon toute une nuit. On ajoute 15 ml d' H_2O , puis très doucement 3 ml d' HCl 1N. La phase organique est ensuite extraite 3 fois avec 20 ml de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et filtrées. Le mélange réactionnel est évaporé à sec et déposé sur colonne de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (1/1). Le produit 19 est récupéré sous la forme d'un solide blanc (Masse : 650 mg ; Rendement : 77%).

CCM : $R_f = 0,4$ (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4)

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) : δ : 1,22 (s ; 14H (12Hc, 2Hd)) ; 1,47-1,58 (m ; 4H(2Hb, 2He) ; 2,27 (t ; $J=7,5$ Hz ; 2Ha) ; 3,18 (t ; $J=6,9$ Hz ; 2Hf)

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) : δ : 24,49 (Cb) ; 26,55 (Cd) ; 28,01 ; 28,68 ; 28,88 ; 28,98 ; 29,05 ; 29,21 ; 29,29 (6Cc, Ce) ; 33,95 (Ca) ; 51,28 (Cf) ; 180,33 (COOH)

Synthèse du N-((2S,3S,4R)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxyoctadecan-2-yl)-8-phenyl-octanamide (20)

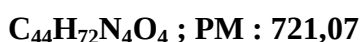
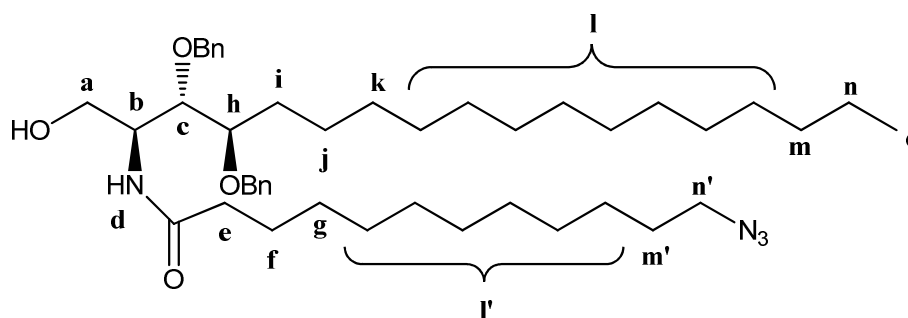


De l'acide 8-phényl-octanoïque (231 mg ; 1,05 mmoles) et du BOP (557 mg ; 1,26 mmoles) sont solubilisés dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre. Après 10 minutes d'agitation sous argon, le produit 18 (524 mg ; 1,05 mmoles) et de la diisopropyl-éthylamine (DIEA) (186 µl ; 1,05 mmoles) tous deux préalablement dissous dans 20 ml de CH₂Cl₂, sont ajoutés au milieu réactionnel. Le milieu est laissé 5 heures sous agitation et sous argon. Puis la phase organique est lavée par HCl 1N (30 ml), par NaHCO₃ saturé (30 ml) et enfin une solution de saumure (30 ml). La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO₄ et filtrée. Le mélange réactionnel est évaporé à sec et déposé sur colonne de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3). Le produit 20 est récupéré sous la forme d'une huile incolore (Masse : 338 mg ; Rendement : 48%).

CCM : R_f = 0,5 (cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,89 (t ; J=6,7 Hz ; 3Ho) ; 1,27-1,62 (m ; 36H(2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hi, 2Hf, 2Hg, 2Hp, 2Hq ; 2Hr) ; 2,00 (m ; 2He) ; 2,60 (t ; 2Hs ; J=7,5 Hz) ; 3,49 (m ; Ha) ; 3,71 (m ; 2H ; Hh ; Hc) ; 3,99 (m ; 1Ha) ; 4,14 (m ; Hb) ; 4,44-4,75 (dd ; 4H, 2xCH₂Phe) ; 6,03 (d ; J=8,2 Hz ; Hd) ; 7,16-7,36 (m ; 15 Haro)

Synthèse du 12-azido-N-((2S,3S,4R)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxyoctadecan-2-yl) dodecanamide (21)



Le produit 19 (30 mg ; 0,13 mmole) et le BOP (72 mg ; 0,163 mmole) sont dissous avec du dans 2 ml de CH_2Cl_2 anhydre. Après 10 minutes d'agitation sous argon, l'amine 18 (63 mg ; 0,126 mmole) et de la DIEA (26,16 μ l ; 0,151 mmole) dissous dans 3 ml de CH_2Cl_2 , sont ajoutés au milieu réactionnel. Le milieu est laissé 5 heures sous agitation et sous argon. Puis la phase organique est lavée par HCl 1N (10 ml), par $NaHCO_3$ saturé (10 ml) et enfin une solution de saumure (10 ml). La phase organique est récupérée, séchée sur $MgSO_4$ et filtrée. Le brut réactionnel est évaporé à sec et déposé sur colonne de silice avec comme éluant un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2). Le produit 21 est récupéré sous la forme d'une huile incolore (Masse : 60 mg ; Rendement : 66%).

CCM : $R_f = 0,35$ (cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3))

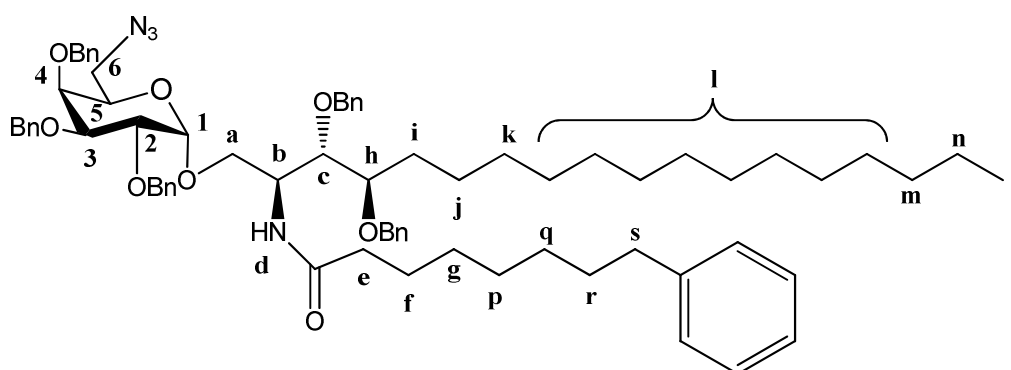
RMN 1H : (300 MHz ; $CDCl_3$) : δ : 0,88 (t ; $J=6,6$ Hz ; 3H_o) ; 1,26-1,61 (m ; 44H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_{m'}, 12H_{l'}, 2H_f, 2H_g, 2H_i) ; 2,00 (m ; 2H_e) ; 2,74 (bs ; OH) ; 3,24 (t ; $J=6,9$ Hz ; 2H_{n'}) ; 3,61 (dd ; $J=11,6$ Hz ; $J=4,2$ Hz ; 1H_a) ; 3,70 (m ; 2H(H_c, H_h)) ; 3,99 (dd ; $J=11,5$ Hz ; $J=3,2$ Hz ; 1H_a) ; 4,10 (m ; H_b) ; 4,46 (d ; $J=11,2$ Hz ; 1H, CH₂Phe) ; 4,58-4,73 (3d ; $J=11,2$ Hz ; 3H, CH₂Phe) ; 6,09 (d ; $J=8,2$ Hz ; H_d) ; 7,32 (m ; 10 Haro)

RMN ^{13}C (100 MHz ; $CDCl_3$) : δ : 14,26 (C_o) ; 22,84 (C_n) ; 25,77 ; 26,18 (C_j ; C_f) ; 29,28 ; 29,43 ; 29,47 ; 29,51 ; 29,59 ; 29,74 ; 29,81 ; 28,86 (8C_l ; 6C_{l'} ; C_k ; C_g) ; 31,00 (C_i) ; 32,07 (C_m) ; 36,82 (C_e) ; 50,80 (C_b) ; 51,64 (C_k) ; 63,13 (C_a) ; 73,06 ; 73,21 (2x CH₂-Phe) ; 79,22

(Cc) ; 82,47 (Ch) ; 128,10 ; 128,25 ; 128,32 ; 128,61 ; 128,86 (10 Caro) ; 137,96 ; 138,28 (2Cq) ; 173,03 (HN-CO-CH₂)

3) Synthèse des analogues du KRN7000

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4-tetra-O-benzyl-6-azido-6-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-(8-phenyl-N-octanamido)-3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (22)



C₇₃H₉₆N₄O₈ ; PM : 1157,56

Le produit 10 (681 mg ; 1,22 mmoles) est dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre. On ajoute sous agitation et sous argon du dibrome (62 μ l ; 1,2 mmoles) à 0°C. Après 10 minutes d'agitation sous argon, du tamis moléculaire de 4Å est ajouté (1 g), et laissé pendant 30 min à 0°C. Le bromure de tétrabutylammonium (479 mg ; 1,48 mmoles) est ajouté. Après 5 minutes, la céramide 20 (347 mg ; 0,49 mmole) et la DIEA (84,8 μ l ; 0,49 mmole) préalablement dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ sont ajoutés au milieu réactionnel remontés à température ambiante. La réaction est laissée 24 heures sous agitation et sous argon. Le milieu est ensuite évaporé à sec et le mélange est chromatographié sur colonne de silice avec comme éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1 à 8/2). Le produit 22 est récupéré sous la forme d'une huile incolore (Masse : 190 mg ; Rendement 60%).

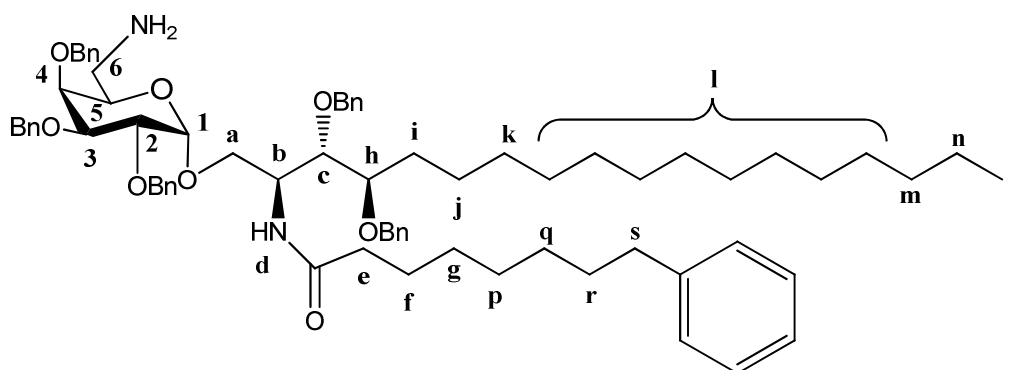
CCM : R_f = 0,45 (cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,90 (t ; J=6,9 Hz ; 3H_o) ; 1,24-1,70 (m ; 36H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_g, 2H_p, 2H_q, 2H_i, 2H_r, 2H_f) ; 1,93 (m ; 2H_e) ; 2,59 (t ; 2H_s ; J=7,2 Hz) ; 3,00 (dd ; H₆ ; J=12,4 Hz ; J=4,7 Hz) ; 3,46 (m ; 2H ; H₆, H₅) ; 3,76-4,07 (m ; 5H(H₃, H₂,

H4, Hc, Hh)) ; 4,30 (m ; Hb) ; 4,49-5,02 (m ; 11H(5xCH₂Phe, H1 J=3,4 Hz à 4,86) ; 5,89 (d ; J=8,6 Hz ; Hd) ; 7,15-7,40 (m ; 30 Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,20 (Co) ; 21,09 (Cn) ; 25,73 ; 25,98 (Cj ; Cf) ; 29,27 ; 29,36 ; 29,44 ; 29,78 ; 29,90 ; 30,16 ; 30,25 (8Cl ; Ck ; Cg ; Ci ; Cp ; Cq) ; 31,54 ; 32,00 (Cm+Cr) ; 36,01 (Cs) ; 36,76 (Ce) ; 50,23 (Cb) ; 51,46 (C6) ; 68,87 (Ca) ; 70,12 (C5) ; 71,90 ; 73,33 ; 73,51 ; 73,61 ; 73,69 (5xOCH₂) ; 76,58 (C4) ; 77,45 (C2) ; 78,88 ; 79,43 ; 79,92 (C3 ; Cc ; Ch) ; 99,16 (C1) ; 125,65 ; 127,52 ; 127,61 ; 127,67 ; 127,73 ; 127,80 ; 127,88 ; 127,99 ; 128,29 ; 128,43 ; 128,50 (30 Caro) ; 138,17 ; 138,44 ; 138,56 ; 138,61 ; 138,73 (5Cq) ; 142,81 (Cq) ; 172,78 (HN-CO-CH₂)

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4-tetra-O-benzyl-6-amino-6-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-2-(8-phenyl-N-octanamido)- 3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (23)



C₇₃H₉₈N₂O₈ ; PM : 1131,56

Le produit 22 (500 mg ; 0,43 mmole) est dissous dans un mélange THF/H₂O (9ml/2ml) et la PPh₃ est ajouté (340 mg ; 1,29 mmoles). La réaction est agitée pendant 12 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant CH₂Cl₂/MeOH (100/0 à 95/5). Le produit 23 est récupéré sous la forme d'une huile jaunâtre (Masse : 466 mg ; Rendement : 95%).

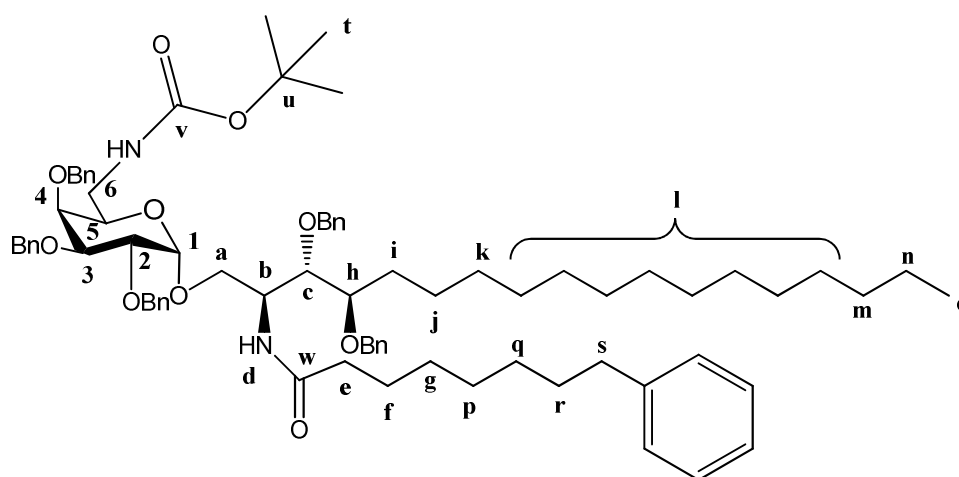
CCM : R_f =0,3 (CH₂Cl₂/MeOH (95/5))

RMN ¹H : (400 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,96 (t ; J=7,0 Hz ; 3Ho) ; 1,35-1,68 (m ; 36H(2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hg, 2Hp, 2Hq, 2Hi, 2Hr, 2Hf) ; 2,03 (m ; 2He) ; 2,63 (t ; 2Hs ; J=7,2 Hz) ; 2,91 (m ; H6) ; 3,64 (m ; 2H ; H6, H5) ; 3,89-4,14 (m ; 7H(H3, H2, H4, Hc, Hh, 2Ha)) ; 4,32

(m ; Hb) ; 4,58-5,05 (m ; 11H(5xCH₂Phe, H1) ; 6,42 (d ; Hd ; J=8,5 Hz) ; 7,19-7,42 (m ; 30 Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,24 (Co) ; 22,79 (Cn) ; 25,80 ; 26,08 (Cj ; Cf) ; 29,28 ; 29,39 ; 29,46 ; 29,80 ; 29,90 ; 30,21 (8Cl ; Ck ; Cg ; Ci ; Cp ; Cq) ; 31,56 (Cr) ; 32,02 (Cm) ; 36,03 (Cs) ; 36,75 (Ce) ; 42,61 (C6) ; 50,73 (Cb) ; 68,86 (Ca) ; 71,93 (C5) ; 72,73 ; 73,19 ; 73,51 ; 73,56 ; 74,56 (5xOCH₂) ; 74,95 (C4) ; 77,49 (C2) ; 79,50 ; 79,73 ; 79,92 (C3 ; Cc ; Ch) ; 99,44 (C1) ; 125,38 ; 127,51 ; 127,62 ; 127,67 ; 127,74 ; 127,85 ; 127,91 ; 128,30 ; 128,42 ; 128,51 ; 128,56 ; 128,63 (30 Caro) ; 137,85 ; 138,49 ; 138,63 ; 138,72 ; 138,78 (5Cquat) ; 142,77 (Cquat) ; 172,90 (HN-CO-CH₂)

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4-tetra-O-benzyl-6-*tert*-butyl-N-carbamate-6-deoxy- α -D-galacto- pyranosyl)-2-(8-phenyl-N-octanamido)- 3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (24)



C₇₈H₁₀₆N₂O₁₀ ; PM : 1231,68

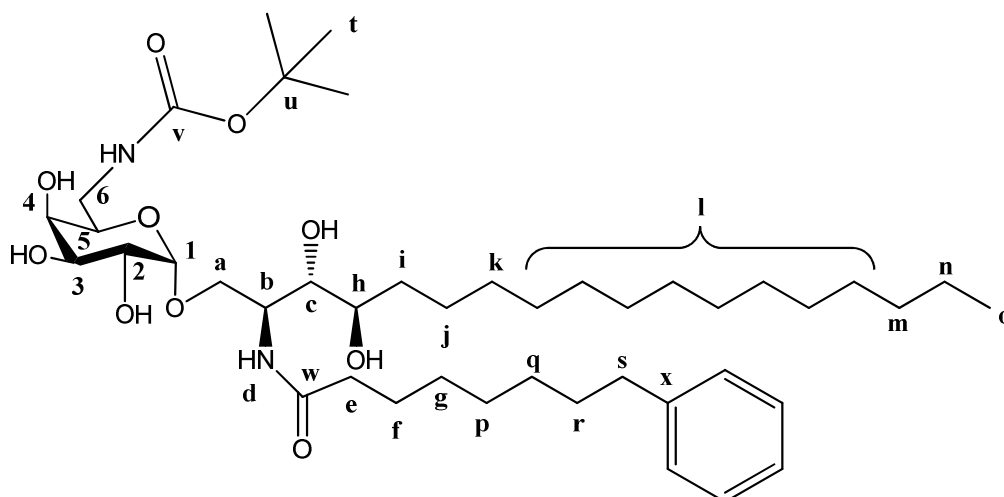
Le produit 23 (270 mg ; 0,24 mmole) et de la DIEA (70 μ l ; 0,36 mmole) sont dissous dans 3 ml de MeOH. Après 10 minutes, du di-*tert*-butyl-dicarbonate (Boc₂O) (78 mg ; 0,36 mmole) dissous dans 2 ml de MeOH est ajouté. Après 4 heures sous agitation, le solvant est évaporé et le brut redissous dans 10 ml de CH₂Cl₂. On lave la phase aqueuse avec de l'eau (10 ml) et de la saumure (10 ml). Puis la phase aqueuse est extraite par 3 x 10 ml de CH₂Cl₂ et les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et filtrées. Le mélange est ensuite déposé sur colonne de silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2). Le produit 24 est récupéré sous la forme d'une huile incolore (Masse : 168 mg ; Rendement : 57%).

CCM : R_f = 0,6 (cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,94 (t ; J=6,6 Hz ; 3H_o) ; 1,29-1,66 (m ; 45H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_g, 2H_p, 2H_q, 2H_i, 2H_r, 2H_f, 9H_{Boc}) ; 1,99 (m ; 2H_e) ; 2,62 (t ; 2H_s ; J=7,7 Hz) ; 3,19 (m ; 2H₆) ; 3,55 (m ; H₅) ; 3,76-4,11 (m ; 7H(H₃, H₂, H₄, H_c, H_h, 2H_a)) ; 4,25 (m ; H_b) ; 4,49-5,02 (m ; 11H(5xCH₂Phe, H₁ ; J=3,2Hz)) ; 6,05 (d ; H_d ; J=8,4 Hz) ; 7,19-7,45 (m ; 30 H_{aro})

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,05 (C_o) ; 22,61 (C_n) ; 25,55 ; 25,93 (C_j ; C_f) ; 26,84 ; 27,34 ; 28,29 ; 29,14 ; 29,23 ; 29,29 ; 29,64 ; 29,73 ; 29,87 ; 30,11 (8C_l ; C_k ; C_g ; C_i ; C_p ; C_q ; 3C_t) ; 31,40 ; 31,86 (C_r ; C_m) ; 35,87 (C_s) ; 36,51 (C_e) ; 41,08 (C₆) ; 50,24 (C_b) ; 68,35 (C_a) ; 69,22 (C₅) ; 71,62 ; 73,04 ; 73,29 ; 73,51 (5xOCH₂) ; 74,43 (C₄) ; 78,87 ; 79,16 ; 79,81 (C₃ ; C_c ; C_h) ; 99,06 (C₁) ; 125,51 ; 127,35 ; 127,47 ; 127,55 ; 127,63 ; 127,75 ; 127,83 ; 128,14 ; 128,28 ; 128,35 ; 128,60 (30 C_{aro}) ; 138,18 ; 138,32 ; 138,48 ; 138,58 (5C_{quat}) ; 142,66 (C_{quat}) ; 155,93 (C_v) ; 172,65 (C_w)

Synthèse du KRN-Phe-Boc



C₄₃H₇₆N₂O₁₀ ; PM : 781,07

Le produit 24 (55 mg ; 0,045 mmole) est dissous dans un volume de 6 ml d'un mélange de THF/MeOH (1/2). Le milieu est bullé pour permettre son dégazage grâce à l'utilisation d'un ballon de baudruche rempli d'argon. Une aiguille donnant sur l'extérieur permet aux vapeurs

de solvants d'être évacuées. On retire le ballon d'argon et on ajoute du Pd/C (50 mg). Le milieu est mis sous atmosphère d'H₂ à 60 psi pendant 3 jours, sous agitation. Le Pd/C est filtré sur célite et le milieu est rincé plusieurs fois au THF, puis au CH₂Cl₂/MeOH (1/1). La phase organique est ensuite évaporée et le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un éluant CH₂Cl₂/MeOH (9/1). Le produit KRN-Phe-Boc est récupéré sous la forme d'un solide blanc (Masse : 24 mg ; Rendement : 69%).

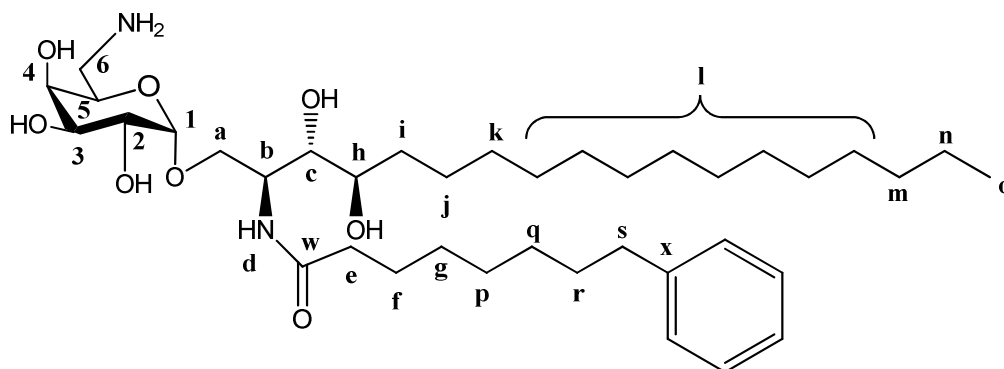
CCM : R_f = 0,3 (CH₂Cl₂/MeOH (9/1))

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 0,84 (t ; J=7,0 Hz ; 3Ho) ; 1,21-1,62 (m ; 45H(2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hg, 2Hp, 2Hq, 2Hi, 2Hr, 2Hf, 9Ht) ; 2,16 (t ; 2He ; J=7,5Hz) ; 2,56 (t ; 2Hs ; J=7,7 Hz) ; 3,10 (m ; 1H6) ; 3,35 (m ; 1H6) ; 3,49 (m ; 2H ; Hh, Hc) ; 3,66-3,78 (m ; 6H(H3, H2, H4, H5, 2Ha)) ; 4,83 (d ; H1 ; J=3,4Hz) ; 5,85 (m ; NH) ; 7,11-7,30 (m ; 5 Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 14,29 (Co) ; 23,00 (Cn) ; 26,20 (Cf) ; 26,79 (Cj) ; 28,58 ; 29,51 ; 29,60 ; 29,65 ; 29,69 ; 29,99 ; 30,06 ; 30,15 ; 31,83 ; 32,27 ; 33,81 (8Cl ; Ck ; Cg ; Ci ; Cp ; Cq ; Cr ; Cm ; 3Ct) ; 36,26 (Cs) ; 36,81 (Ce) ; 40,75 (C6) ; 50,75 (Cb) ; 67,80 (Ca) ; 69,28 ; 69,45 ; 69,56 ; 70,40 (C2 ; C3 ; C4 ; C5) ; 72,49 (Cc) ; 75,18 (Ch) ; 80,24 (Cu) ; 100,11 (C1) ; 125,92 ; 128,58 ; 128,69 (5 Caro) ; 143,13 (Cx) ; 157,82 (Cv) ; 174,72 (Cw)

HRMS : 781,5593 g.mol⁻¹ [M+H]⁺ ; masse exacte : 781,5578 g.mol⁻¹ [M+H]⁺

Synthèse du KRN-Phe-NH₂



C₃₈H₆₈N₂O₈ ; PM : 680,95

Le produit KRN-Phe-Boc (32 mg ; 0,041 mmole) est dissous dans un volume de 3 ml d'un mélange de TFA/CH₂Cl₂ (2/8). Le milieu est laissé sous agitation pendant 2 heures. Le milieu est évaporé à sec, et le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un éluant CH₂Cl₂/MeOH/TEA (9/1/0,1). Le produit KRN-Phe-NH₂ est récupéré sous la forme d'un solide blanc (Masse : 16 mg ; Rendement 56%).

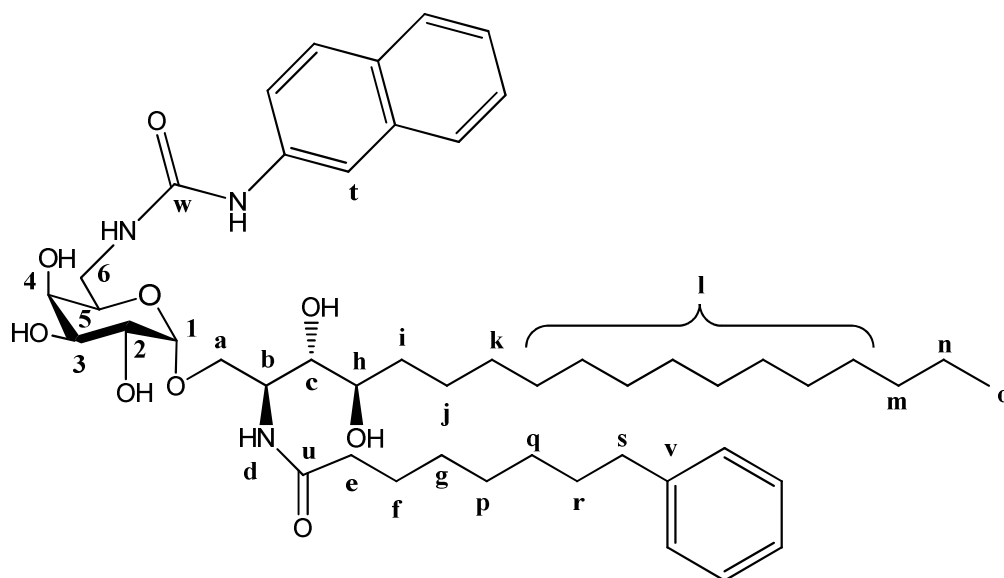
CCM : R_f = 0,2 (CH₂Cl₂/MeOH/TEA (85/15/0,1))

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 0,8 (t ; 3H_o ; J=7,0 Hz) ; 1,17-1,52 (m ; 36H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_g, 2H_p, 2H_q, 2H_i, 2H_r, 2H_f) ; 2,11 (t ; 2H_e ; J=7,6Hz) ; 2,52 (t ; 2H_s ; J=7,8 Hz) ; 2,79 (dd ; 1H₆ ; J=13,3Hz ; J=4,0Hz) ; 2,95 (dd ; 1H₆ ; J=13,3Hz ; J=7,5Hz) ; 3,43-3,82 (m ; 8H ; H_h, H_c, 2H_a, H₂, H₃, H₄, H₅) ; 4,83 (d ; H₁ ; J=3,8Hz) ; 7,07-7,18 (m ; 5 H_{aro})

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 13,03 (C_o) ; 21,74 (C_n) ; 24,92 (C_f) ; 25,52 (C_j) ; 27,70 ; 28,24 ; 28,34 ; 28,44 ; 28,73 ; 28,80 ; 28,88 ; 30,56 ; 31,01 ; 32,01 ; 32,55 (8C_l ; C_k ; C_g ; C_i ; C_p ; C_q ; C_r ; C_m) ; 34,99 (C_s) ; 35,56 (C_e) ; 41,23 (C₆) ; 49,58 (C_b) ; 66,28 (C_a) ; 67,91 ; 69,04 ; 69,86 (C₂ ; C₃ ; C₄ ; C₅) ; 71,08 (C_c) ; 74,12 (C_h) ; 98,86 (C₁) ; 124,66 ; 127,30 ; 127,44 (5 C_{aro}) ; 141,86 (C_x) ; 162,97 (C_v) ; 186,68 (C_w)

HRMS : 681,5058 g.mol⁻¹ [M+H]⁺ ; masse exacte : 681,5054 g.mol⁻¹ [M+H]⁺

Synthèse du KRN-Phe-Naph



C₄₉H₇₅N₃O₉ ; PM : 850,13

Le 2-isocyanate-naphtalene (1 mg ; 0,0072 mmole) est ajouté à une solution d'amine KRN-Phe-NH₂ (5 mg ; 0,0066 mmole) dissous dans de la DMF (1 ml) à température ambiante. Le milieu est laissé sous agitation pendant 2 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est déposé sur colonne de silice avec un mélange d'éluant CH₂Cl₂/MeOH (9/1). Le produit KRN-Phe-Naph est récupéré sous la forme d'une huile jaunâtre (Masse : 5 mg ; Rendement : 80%).

CCM : R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH (9/1))

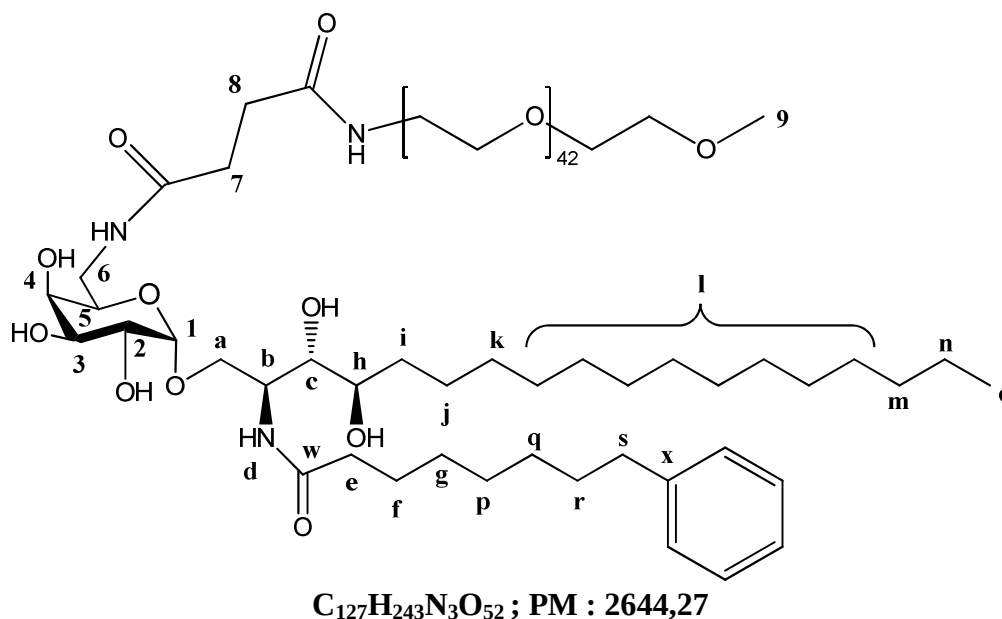
RMN ¹H : (500 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 0,83 (t ; 3H_o ; J=6,7 Hz) ; 1,17-1,62 (m ; 36H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_g, 2H_p, 2H_q, 2H_i, 2H_r, 2H_f) ; 2,11 (t ; 2H_e ; J=7,8 Hz) ; 2,50 (t ; 2H_s ; J=7,6 Hz) ; 3,26 (m ; 1H₆) ; 3,50 (m ; 3H ; 1H₆, H_c, H_h) ; 3,64-4,86 (m ; 6H ; H₄, H₅, H₃, 2H_a, H₂) ; 4,11 (m ; H_b) ; 4,86 (d ; H₁ ; J=2,9 Hz) ; 7,08-7,36 (m ; 8 H_{aro}) ; 7,68 (m ; 3H_{aro}) ; 7,88 (s ; H_t)

RMN ¹³C (125 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 14,38 (C_o) ; 23,06 (C_n) ; 26,24 (C_f) ; 29,53 ; 29,63 ; 29,73 ; 30,04 ; 30,09 ; 30,17 ; 31,90 ; 32,30 (8C_l ; C_k ; C_g ; C_i ; C_j ; C_p ; C_q ; C_r ; C_m) ; 36,25 ; 36,72 (C_s ; C_e) ; 40,37 (C₆) ; 50,66 (C_b) ; 67,21 ; 69,14 ; 69,72 ; 70,13 ; 70,23 (C_a ; C₂ ; C₃ ; C₄ ; C₅) ; 72,41 (C_c) ; 74,62 (C_h) ; 99,67 (C₁) ; 115,04 (C_t) ; 120,18 ;

124,56 ; 125,90 ; 126,65 ; 127,52 ; 127,84 ; 128,55 ; 128,70 ; 128,91 (11 Caro) ; 130,15 ; 134,46 ; 137,12 (3 Cquat.) ; 143,14 (Cv) ; 157,60 (Cu) ; 175,17 (Cw)

HRMS : 850,5576 g.mol⁻¹ [M+H]⁺ ; masse exacte : 850,5582 g.mol⁻¹ [M+H]⁺

Synthèse du KRN-Phe-PEG₂₀₀₀



Du BOP (5 mg ; 10,95 µmoles) et de l'acide polyéthylène glycol (n=42) (22 mg ; 10,95 µmoles) sont dissous dans 1 ml de CH₂Cl₂. Après agitation pendant 5 minutes, le produit KRN-Phe-NH₂ (5 mg ; 7,3 µmoles) dissous dans 1 ml de CH₂Cl₂ et de DIEA (1,3 µl ; 7,3 µmoles) sont additionnés au milieu réactionnel. La réaction est laissée sous argon et sous reflux pendant 3 jours. Le solvant est évaporé à sec et le mélange est purifié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant CH₂Cl₂/MeOH (9/1). Le résidu obtenu est précipité dans de l'éther pour donner le produit KRN-Phe-PEG₂₀₀₀ sous forme d'un solide blanc (Masse : 4 mg ; Rendement : 23 %).

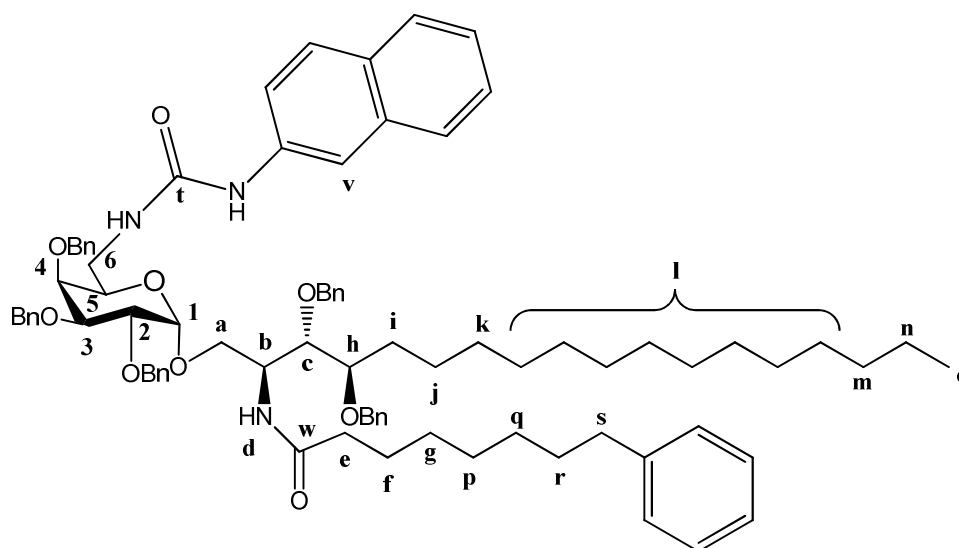
CCM : R_f = 0,2 (CH₂Cl₂/MeOH (8/2))

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 0,80-1,54 (m ; 39H (3Ho, 2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hg, 2Hp, 2Hq, 2Hi, 2Hr, 2Hf, 6Hh')) ; 2,11 (t ; 2He, J=7,8Hz) ; 2,51 (t ; 2Hs,

$J=7,8\text{Hz}$) ; 3,08 (dd ; 1H6, $J=14,6\text{Hz}$; $J=7,3\text{ Hz}$) ; 3,39-3,76 (m ; 184H(168H PEG; 1H6 ; H5 ; H3 ; H2 ; 2Ha ; Hh ; Hc ; H4, 2H7, 2H8, 3H9) ; 4,80 (m ; H1) ; 7,07-7,34 (m ; 5Haro).

MALDI : $2643,682\text{ g.mol}^{-1}$ $[\text{M}+\text{H}]^{+}$; masse exacte : $2642,646\text{ g.mol}^{-1}$

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4-tetra-O-benzyl-6-naphtureido-6-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-(8-phenyl-N-octanamido)- 3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (25)



$\text{C}_{84}\text{H}_{105}\text{N}_3\text{O}_9$; PM : 1300,74

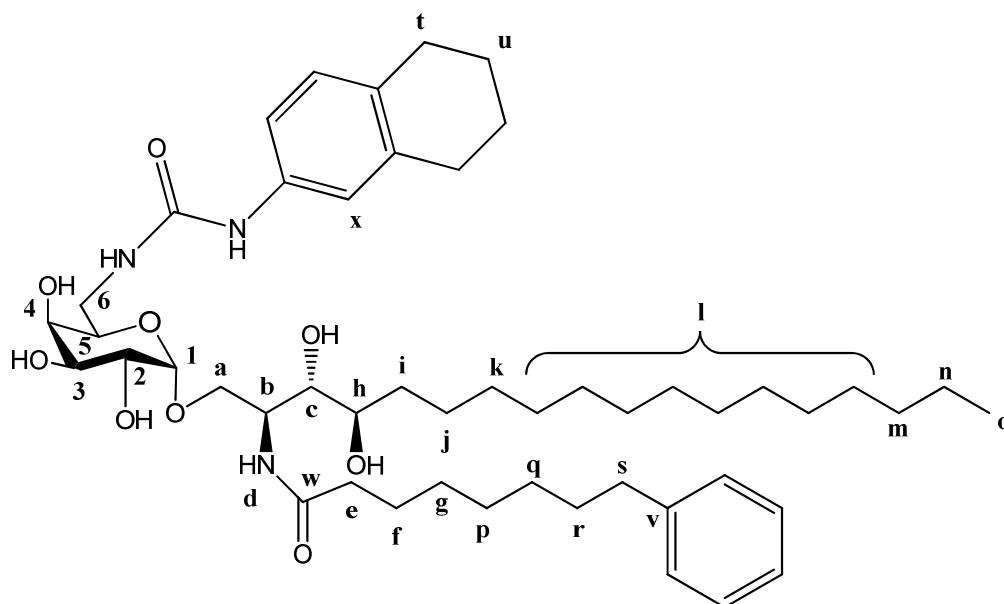
Le produit 23 (190 mg ; 0,17 mmole) et le 2-isocyanate-naphtalene (35,5 mg ; 0,21 mmole) sont ajoutés à de la DMF (4 ml) à température ambiante pendant 3 heures. Le solvant est évaporé et le mélange est déposé sur colonne de silice avec un mélange d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2). Le produit 25 est récupéré sous la forme d'un solide blanc (Masse : 131 mg ; Rendement : 60%).

CCM : $R_f = 0,25$ (cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3))

RMN ^1H : (300 MHz ; CDCl_3) : δ : 0,92 (t ; $J=6,5\text{ Hz}$; 3Ho) ; 1,22-1,72 (m ; 36H(2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hg, 2Hp, 2Hq, 2Hi, 2Hr, 2Hf) ; 1,94 (m ; 2He) ; 2,53 (t ; 2Hs ; $J=7,6\text{ Hz}$) ; 3,43 (m ; 2H6) ; 3,63-4,09 (m ; 8H ; H4, H5, H3, 2Ha, H2, Hc, Hh) ; 4,47-4,99 (m ; 12H ; Hb, 5xCH₂aro, H1) ; 5,38 (m ; NH) ; 6,01 (d ; NH(d) ; $J=8,1\text{Hz}$) ; 7,13-7,43 (m ; 32 Haro) ; 7,68-7,74 (m ; 4Haro) ; 8,02 (m ; Hv)

RMN ^{13}C (100 MHz ; $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (8/2)) : δ : 14,12 (Co) ; 22,74 (Cn) ; 25,80 ; 25,88 (Cf ; Cj) ; 29,19 ; 29,25 ; 29,41 ; 29,75 ; 30,23 ; 30,73 ; 31,98 (8Cl ; Ck ; Cg ; Ci ; Cp ; Cq) ; 31,98 (Cr ; Cm) ; 35,90 (Cs) ; 36,90 (Ce) ; 41,68 (C6) ; 51,12 (Cb) ; 70,00 (Ca) ; 71,27 (C5) ; 72,29 ; 73,03 ; 73,24 ; 73,52 ; 74,73 (5x CH_2Phe) ; 75,90 (C4) ; 76,39 (C2) ; 79,14 (C3) ; 79,49 (Cc) ; 80,80 (Ch) ; 99,74 (C1) ; 114,44 (Cv) ; 119,90 ; 123,90 ; 125,62 ; 126,13 ; 127,27 ; 127,62 ; 127,72 ; 127,80 ; 127,88 ; 127,94 ; 128,05 ; 128,25 ; 128,38 ; 128,43 ; 128,47 ; 128,56 ; 129,68 (36 Caro) ; 134,31 ; 137,35 ; 138,30 ; 138,49 ; 138,64 ; 142,74 (9Cq) ; 155,81 (Cw) ; 174,22 (Ct)

Synthèse du KRN-Phe-Tet



$\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_9$; PM : 854,16

Le produit 25 (78 mg ; 0,059 mmole) est dissous dans 6 ml d'un mélange MeOH/THF (2/1). Le milieu est bullé pour permettre son dégazage grâce à l'utilisation d'un ballon de baudruche rempli d'argon. Une aiguille donnant sur l'extérieur permet aux vapeurs de solvants d'être évacuées. Le ballon d'argon est retiré et on ajoute du Pd/C (35 mg). Le milieu est mis sous agitation avec un ballon de baudruche rempli de H_2 placé au dessus du milieu réactionnel. On laisse sous agitation et sous H_2 pendant 12 heures. Le Pd /C est filtré sur célite et le milieu est rincé plusieurs fois avec du THF et un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1). La phase organique est évaporée et le mélange est chromatographié sur colonne de silice avec un éluant

CH₂Cl₂/MeOH (9/1). Le produit KRN-Phe-Tet est récupéré sous la forme d'un solide blanc (Masse : 32 mg ; Rendement : 62%).

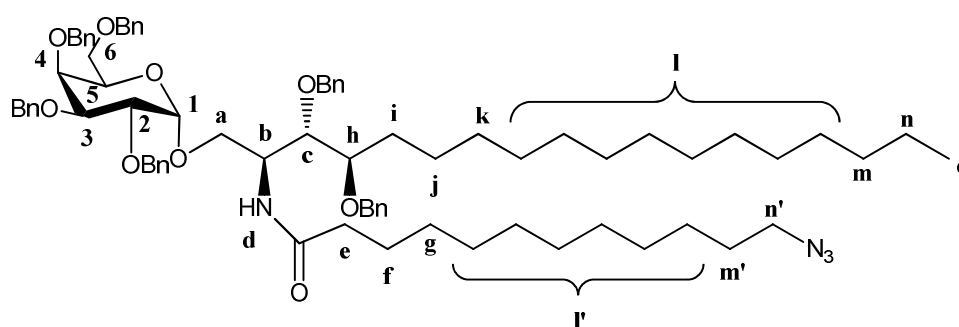
CCM : R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH (9/1))

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 0,83 (t ; J=7,0 Hz ; 3H_o) ; 1,21-1,72 (m ; 40H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_g, 2H_p, 2H_q, 2H_i, 2H_r, 2H_f, 2H_u) ; 2,13 (t ; 2H_e ; J=7,5 Hz) ; 2,53 (t ; 2H_s ; J=7,7 Hz) ; 2,65 (m ; 4H_t) ; 3,20 (m ; 1H₆) ; 3,45 (m ; 3H ; H₆, H_c, H_h) ; 3,62-3,84 (m ; 6H(H₃, H₂, H₄, H₅, 2H_a)) ; 4,12 (m ; H_b) ; 4,83 (d ; H₁ ; J=3,2 Hz) ; 7,00-7,21 (m ; 8 Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 13,02 (C_o) ; 21,76 (C_n) ; 22,29 ; 22,45 (2C_u) ; 24,96 (C_f) ; 27,86 ; 28,27 ; 28,35 ; 28,39 ; 28,45 ; 28,65 ; 28,75 ; 28,81 ; 28,92 ; 30,60 ; 31,02 ; 31,02 ; 31,81 (8C_l ; C_k ; C_g ; C_i ; C_j ; C_p ; C_q ; C_r ; C_m ; 2C_t) ; 35,53 (C_s) ; 39,24 (C₆) ; 49,73 (C_b) ; 68,07 ; 68,48 ; 69,16 (C_a ; C₂ ; C₃ ; C₄ ; C₅) ; 71,18 (C_c) ; 73,74 (C_h) ; 98,71 (C₁) ; 116,42 (C_x) ; 119,17 ; 124,65 ; 127,30 ; 127,44 ; 128,51 (8 Caro) ; 130,91 ; 135,40 ; 136,69 (3C_q) ; 141,88 (C_v) ; 156,53 (C_w) ; 173,83 (NH-CO-NH)

HRMS : 854,5876 g.mol⁻¹ [M+H]⁺ ; masse exacte : 854,5895 g.mol⁻¹ [M+H]⁺

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-galactopyranosyl)-2-(12-azido-N-dodecanamido)-3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (26)



C₇₈H₁₀₆N₄O₉ ; PM : 1243,7

Le produit 5 (sucre) (407 mg ; 0,7 mmole) est dissous dans 3 ml de CH₂Cl₂ anhydre. On ajoute sous agitation et sous argon du HBr 33% dans l'acide acétique (0,17 ml ; 0,98 mmole).

Après 15 minutes d'agitation sous argon, du toluène anhydre est ajouté (4 ml) et le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le mélange est mis à sécher à la pompe à vide.

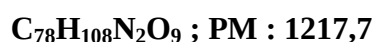
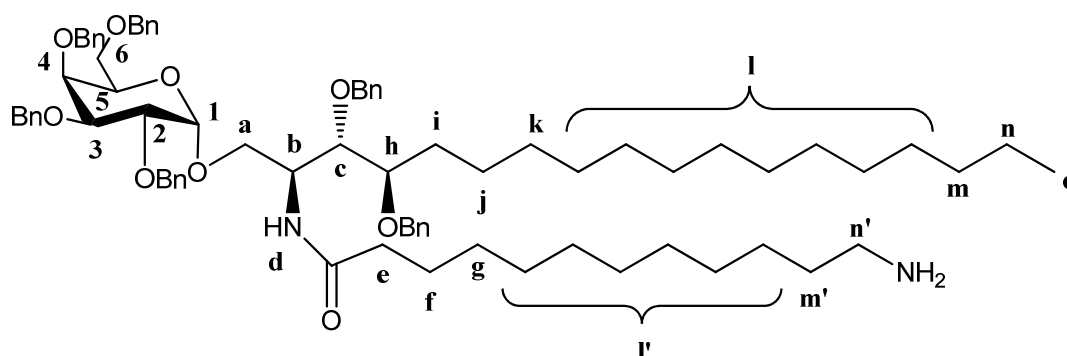
Sous argon et en présence de tamis moléculaire de 4Å, le mélange réactionnel est redissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (6 ml), puis on ajoute le bromure de tétrabutylammonium (316 mg ; 0,98 mmole). Après 5 minutes, la céramide 21 (200 mg ; 0,28 mmole) et la DIEA (52 µl ; 0,30 mmole) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. Puis de l'H₂O (10 ml) est ajouté au milieu réactionnel. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite par du CH₂Cl₂ (3 fois 20 ml). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées. Le brut est chromatographié sur colonne de silice avec comme éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1 à 8/2). Le produit 26 est récupéré sous la forme d'une huile incolore (Masse : 210 mg ; Rendement : 60%).

CCM : R_f = 0,45 (Cyclohexane/AcOEt (8/2))

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,90 (t ; J=6,9 Hz ; 3H_o) ; 1,24-1,72 (m ; 44H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_m', 12H_l', 2H_f, 2H_g, 2H_i) ; 1,91 (m ; 2H_e) ; 3,25 (t ; J=6,9 Hz ; 2H_n') ; 3,45 (m ; 2H₆+H₅) ; 3,74-4,18 (m ; 8H(H₃, H₂, H₄, H_c, 2H_a, H_b, H_h)) ; 4,36-4,95 (m ; 13H (6 CH₂Phe, H₁ J=3,4 Hz à 4,86) ; 6,17 (d ; J=8,2 Hz ; H_d) ; 7,22 (m ; 30 Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,16 (C_o) ; 22,73 (C_n) ; 25,69 ; 26,76 (C_j ; C_f) ; 28,87 ; 29,20 ; 29,41 ; 29,47 ; 29,57 ; 29,71 ; 29,76 ; 29,88 (8C_l ; 6C_l' ; C_k ; C_g ; C_i) ; 31,97 (C_m+C_m') ; 36,67 (C_e) ; 50,38 (C_b) ; 51,51 (C_n') ; 69,30 ; 69,42 (C₆ ; C_a) ; 70,02 (C₅) ; 73,50 ; 73,63 ; 74,75 (6x CH₂-Phe) ; 74,87 (C₄) ; 78,76 ; 78,84 (C_c ; C_h) ; 80,21 (C₃) ; 99,60 (C₁) ; 127,46 ; 127,53 ; 127,58 ; 127,66 ; 127,72 ; 127,87 ; 127,92 ; 128,27 ; 128,34 ; 128,39 ; 128,44 (30 Caro) ; 138,49 ; 138,66 ; 138,74 (6C_q) ; 172,80 (HN-CO-CH₂)

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-(12-amino-N-dodecanamido)-3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (27)



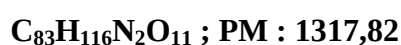
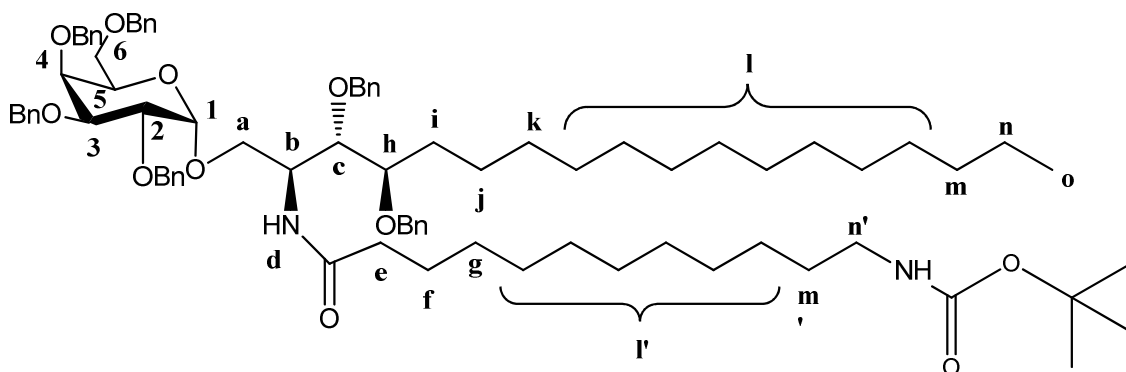
Le produit 26 (210 mg ; 0,168 mmole) est mis en solution dans 3 ml de THF, en présence de PPh₃ (133 mg ; 0,506 mmole) et de 40 μ l d'H₂O. Le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite, puis le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant CH₂Cl₂/MeOH/TEA (95/5/0 à 9/1/0,2). Le produit 27 est récupéré sous la forme d'une huile jaunâtre (Masse : 110 mg ; Rendement : 60%).

CCM : R_f = 0,3 (CH₂Cl₂/MeOH (9/1))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,90 (t ; J=6,8 Hz ; 3H_o) ; 1,25-1,65 (m ; 46H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_{m'}, 12H_{l'}, 2H_f, 2H_g, 2H_i, NH₂)) ; 1,95 (m ; 2H_e) ; 2,81 (t ; J=7,5 Hz ; 2H_{n'}) ; 3,45 (m ; 2H₆+H₅) ; 3,74-4,19 (m ; 8H(H₃, H₂, H₄, H_c, 2H_a, H_b, H_h)) ; 4,37-4,96 (m ; 13H (6 CH₂Phe, H₁ J=3,4 Hz à 4,88) ; 6,27 (d ; J=8,2 Hz ; H_d) ; 7,24 (m ; 30 H_{aro})

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,17 (C_o) ; 22,73 (C_n) ; 25,51 ; 26,79 (C_j ; C_f) ; 29,29 ; 29,41 ; 29,47 ; 29,57 ; 29,75 ; 29,88(8C_l ; 6C_{l'} ; C_k ; C_g ; C_i) ; 30,70 ; 31,96 (C_m+C_{m'}) ; 36,67 (C_e) ; 41,06 (C_{n'}) ; 50,36 (C_b) ; 69,25 ; (C₆ ; C_a) ; 69,98 (C₅) ; 73,53 ; 73,62 ; 74,75 (6x CH₂-Phe) ; 74,83 (C₄) ; 78,77 ; 78,91 (C_c ; C_h) ; 80,18 (C₃) ; 99,46 (C₁) ; 127,48 ; 127,55 ; 127,59 ; 127,67 ; 127,74 ; 127,88 ; 128,27 ; 128,34 ; 128,40 ; 128,44 ; 128,49 ; 128,61 (30 C_{aro}) ; 138,42 ; 138,65 ; 138,72 (6C_{quat}) ; 172,89 (HN-CO-CH₂)

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-(12-(tert-butyl-N-carbamate)-N-dodecanamido)-3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (28)



Le produit 27 (110 mg ; 0,09 mmole) et la DIEA (40 μ l ; 0,18 mmole) sont dissous dans 2 ml de MeOH. Au bout de 10 minutes, le Boc₂O (24 mg ; 0,11 mmole) dissous préalablement dans 1 ml de MeOH, est ajouté au milieu réactionnel. Après 4 heures d'agitation sous argon, le milieu est lavé avec H₂O (10 ml) et une solution de saumure (10 ml). Puis la phase aqueuse est extraite par 3 x 10 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et filtrées. Le mélange est séché et passé sur colonne de silice avec un éluant cyclohexane/acétate d'éthyle (8/2 à 7/3). Le produit 28 est récupéré sous la forme d'une huile incolore (Masse : 84 mg ; Rendement : 71%).

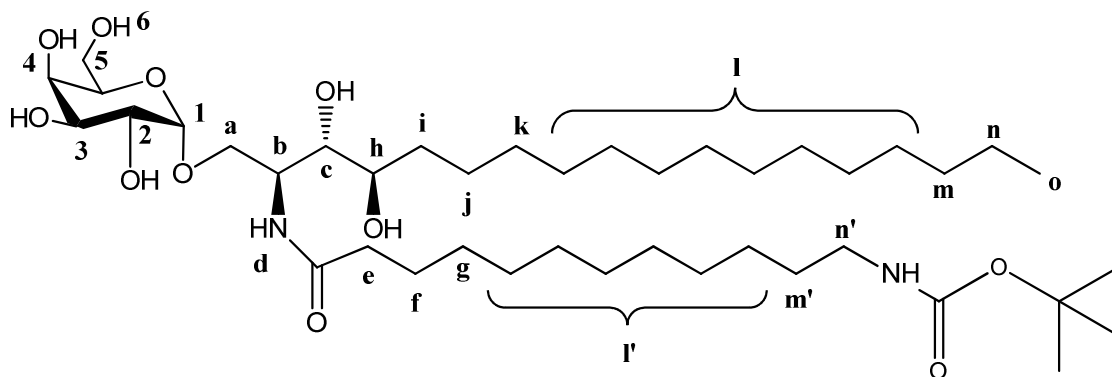
CCM : R_f = 0,7 (cyclohexane/acétate d'éthyle (6/4))

RMN ¹H : (400 MHz ; CDCl₃) : δ : 0,80 (t ; J=6,9 Hz ; 3H_o) ; 1,14-1,70 (m ; 54H(2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_{m'}, 12H_{l'}, 2H_f, 2H_g, 2H_i, 9H (CH₃ Boc), NH (Boc)) ; 1,95 (m ; 2H_e) ; 3,00 (m ; 2H_{n'}) ; 3,35 (m ; 3H ; 2H₆+H₅) ; 3,78-4,10 (m ; 8H(H₃, H₂, H₄, H_c, 2H_a, H_b, H_h)) ; 4,27-4,85 (m ; 13H(6 CH₂Phe, H₁ J=3,4 Hz à 4,88) ; 6,07 (d ; H_d ; J=8,3 Hz) ; 7,21 (m ; 30 H_{ar})

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) : δ : 14,16 (C_o) ; 22,72 (C_n) ; 25,70 ; 26,86 (C_j ; C_f) ; 28,48 (3C_q) ; 29,36 ; 29,40 ; 29,41 ; 29,43 ; 29,48 ; 29,49 ; 29,61 ; 29,76 ; 29,87 ; 29,88 ; 30,11 (8C_l ; 6C_{l'} ; C_k ; C_g ; C_i ; C_{m'}) ; 31,96 (C_m) ; 36,68 (C_e) ; 40,68 (C_{n'}) ; 50,37 (C_b) ; 69,28 ; 69,33 (C₆ ; C_a) ; 70,01 (C₅) ; 70,75 ; 72,93 ; 73,51 ; 73,62 ; 74,75 (6x CH₂-Phe) ; 74,87

(C4) ; 78,76 ; 78,93 ; 79,00 (Cc ; Ch ; Cquat.(Boc)) ; 80,21 (C3) ; 99,55 (C1) ; 127,47 ; 127,53 ; 127,57 ; 127,72 ; 127,87 ; 127,91 ; 128,27 ; 128,34 ; 128,39 ; 128,44 (30 Caro) ; 138,47 ; 138,52 ; 138,66 ; 138,73 ; 138,75 (6Cq) ; 156,00 (CO Boc) ; 172,83 (HN-CO-CH₂)

Synthèse du (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopyranosyl)-2-(12-(*tert*-butyl-N-carbamate)-N-dodecanamido)-3,4-bis(benzyloxy)octadecan-1-ol (29)



C₄₁H₈₀N₂O₁₁ ; PM : 777,08

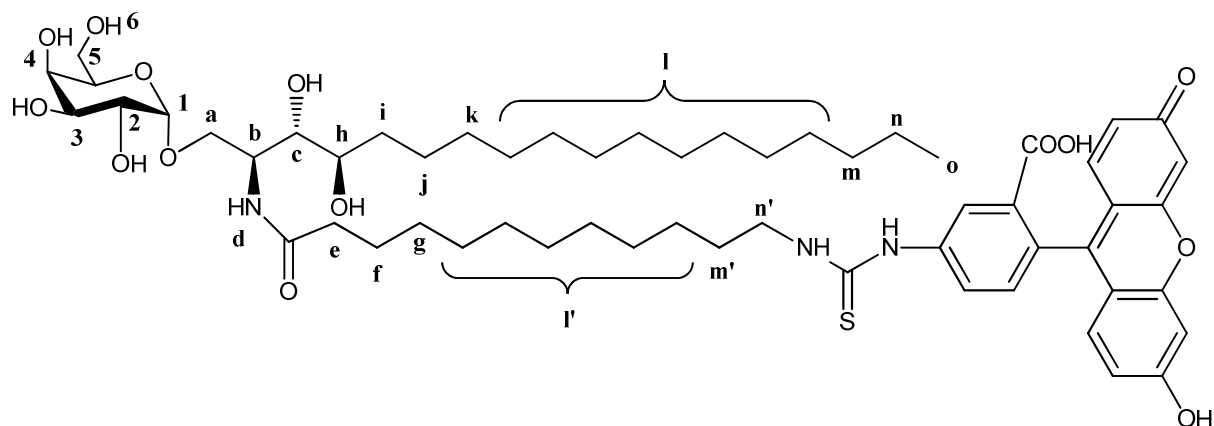
Le produit 28 (235 mg ; 0,18 mmoles) est dissous dans 4 ml de MeOH et 2 ml de THF. Le milieu est bullé pour permettre son dégazage grâce à l'utilisation d'un ballon de baudruche rempli d'argon. Une aiguille donnant sur l'extérieur permet aux vapeurs de solvants d'être évacuées. On retire le ballon d'argon et on ajoute du Pd/C (120 mg). Le milieu est mis sous atmosphère d'H₂ à 60 psi pendant 3 jours. Le Pd/C est filtré sur célite et lavé plusieurs fois avec du THF, puis par un mélange CH₂Cl₂/MeOH (1/1). La phase organique est évaporée séchée. Le résidu est déposé sur colonne de silice avec un éluant CH₂Cl₂/MeOH (9/1). Le produit 29 est récupéré sous la forme d'un solide incolore (Masse : 60 mg ; Rendement 43%).

CCM : R_f = 0,3 (CH₂Cl₂/MeOH (9/1))

RMN ¹H : (300 MHz ; CDCl₃/MeOD (8/2)) : δ : 0,83 (t ; J=6,5 Hz ; 3H_o) ; 1,21-1,58 (m ; 52H (2H_m, 2H_n, 16H_l, 2H_k, 2H_j, 2H_{m'}, 12H_{l'}, 2H_f, 2H_g, 2H_i, 9H (CH₃ Boc), NH (Boc)) ; 2,15 (t ; J=7,7Hz ; 2H_e) ; 3,01 (m ; 2H_{n'}) ; 3,49 (m ; 2H ; 2H₆) ; 3,66-3,87 (m ; 7H(H₃, H₂, H₅, H_c, 2H_a, H_h)) ; 3,90 (d ; J=3,1Hz ; H₄) ; 4,16 (m ; H_b) ; 4,85 (d ; J=3,6Hz ; H₁) ; 7,11 (d ; H_d ; J=8,2 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz ; $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (8/2)) : δ : 13,83 (Co) ; 22,46 (Cn) ; 25,62 ; 25,70 (Cj ; Cf) ; 26,58 (Cm') ; 28,13 (3Cq) ; 29,07 ; 29,14 ; 29,27 ; 29,31 ; 29,45 ; 29,52 ; 29,61 ; 29,73 (8Cl ; 6Cl' ; Ck ; Cg) ; 31,71 (Cm) ; 32,12 (Ci) ; 36,26 (Ce) ; 40,27 (Cn') ; 49,70 (Cb) ; 61,64 (C6) ; 67,38 (Ca) ; 68,56 (Ch) ; 69,61 ; 70,00 ; 70,47 ; 71,91 ; 74,34 ; 74,45 (C2, C3, C4, C5, Cc) ; 79,06 (Cquat.(Boc)) ; 99,43 (C1) ; 156,26 (CO Boc) ; 174,19 (HN-CO-CH₂)

Synthèse du KRN-FITC



$\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{S}$; PM : 1066,35

Le produit 29 (15 mg ; 0,02 mmole) est dissous dans 1,5 ml de CH_2Cl_2 . A 0°C, on ajoute 1 ml de TFA. On laisse sous agitation et sous argon pendant 2 heures à température ambiante. Le milieu est évaporé à sec pour donner le sel de TFA, lequel est repris dans 1,5 ml de DMF avec de la TEA (2,3 μl ; 0,02 mmole) et laissé sous agitation pendant 30 minutes. On ajoute la FITC au milieu (6 mg ; 0,02 mmole) et on laisse sous agitation pendant 12 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière. Le milieu est évaporé à sec et le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1). Le produit KRN-FITC est obtenu sous forme d'une poudre jaunâtre (Masse : 17 mg ; Rendement : 79%).

CCM : Rf = 0,4 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1))

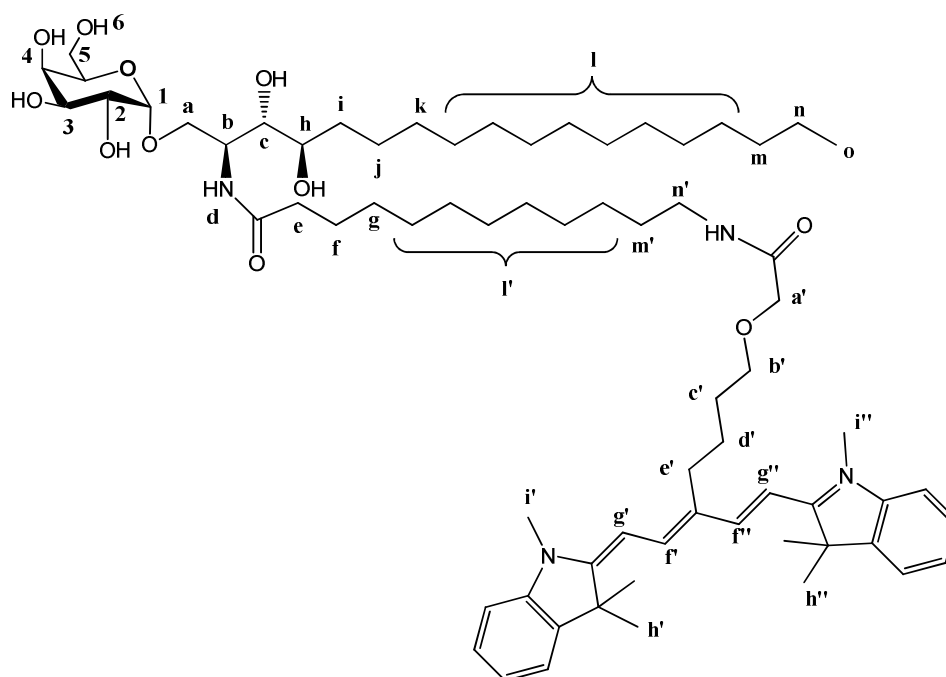
RMN ^1H (400 MHz ; CDCl_3) : δ : 0,81 (t ; J=6,5 Hz ; 3Ho) ; 1,19-1,55 (m ; 44H(2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hm', 12Hl', 2Hf, 2Hg, 2Hi, 2NH)) ; 2,15 (t ; J=7,1 Hz ; 2He) ; 3,49-3,83

(m ; 10H ; 2H6 ; H5 ; H3 ; H2 ; 2Ha ; Hh ; Hc ; H4) ; 4,11 (m ; Hb) ; 6,46-6,63 (m ; 6H FITC) ; 7,05 (d ; Hd ; J=8,1 Hz) ; 7,68-7,86 (m ; 2H FITC) ; 8,17 (bs ; 1H FITC)

RMN ^{13}C (100 MHz ; CDCl_3) : δ : 14,16 (Co) ; 22,72 (Cn) ; 25,70 ; 26,86 (Cj ; Cf) ; 28,48 (3Cq) ; 29,36 ; 29,40 ; 29,41 ; 29,43 ; 29,48 ; 29,49 ; 29,61 ; 29,76 ; 29,87 ; 29,88 ; 30,11 (8Cl ; 6Cl' ; Ck ; Cg ; Ci ; Cm') ; 31,96 (Cm) ; 36,68 (Ce) ; 40,68 (Cn') ; 50,37 (Cb) ; 69,28 ; 69,33 (C6 ; Ca) ; 70,01 (C5) ; 70,75 ; 72,93 ; 73,51 ; 73,62 ; 74,75 (6x $\underline{\text{CH}_2\text{-Phe}}$) ; 74,87 (C4) ; 78,76 ; 78,93 ; 79,00 (Cc ; Ch ; Cquat.(Boc)) ; 80,21 (C3) ; 99,55 (C1) ; 138,47 ; 138,52 ; 138,66 ; 138,73 ; 138,75 (6Cquat) ; 156,00 ($\underline{\text{CO}}$ Boc) ; 172,83 (HN- $\underline{\text{CO}}$ -CH₂)

HRMS : 1066,5700 g.mol⁻¹ [M+H]⁺ ; masse exacte : 1066,5674 g.mol⁻¹ [M+H]⁺

Synthèse du KRN-Cy5



KRN-Cy5 C₆₉H₁₁₁N₄O₁₁ ; PM : 1172,63

Le produit 29 (11 mg ; 0,014 mmole) est dissous dans 1 ml de CH_2Cl_2 . A 0°C, on ajoute 1 ml de TFA. On laisse sous agitation et sous argon pendant 2 heures à température ambiante. Le milieu est évaporé à sec pour donner le sel de TFA, lequel est repris dans 1 ml de CH_2Cl_2 avec de la DIEA (7,3 μl ; 0,042 mmole). En parallèle, du Cy5-COOH est dissous dans 1 ml de CH_2Cl_2 (9 mg ; 0,017 mmole), et du BOP (7 mg ; 0,017 mmole) est ajouté. Le milieu est

laissé sous agitation pendant 10 minutes, puis le sel de TFA et la DIEA sont ajoutés. Le milieu est laissé une nuit sous agitation et sous argon, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Le milieu est évaporé à sec et le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange d'éluant CH₂Cl₂/MeOH (8/2). Le produit KRN-Cy5 est obtenu sous forme d'une poudre violette (Masse : 14 mg ; Rendement : 86%).

CCM : R_f = 0,7 (CH₂Cl₂/MeOH (8/2))

RMN ¹H (400 MHz ; MeOD) : δ : 0,88 (t ; J=6,8 Hz ; 3Ho) ; 1,24-1,85 (m ; 60H(2Hm, 2Hn, 16Hl, 2Hk, 2Hj, 2Hm', 12Hl', 2Hf, 2Hg, 2Hi, 2Hc', 6Hh'', 6Hh')) ; 2,19 (m ; 2He) ; 2,69 (m ; 2He') ; 3,47-3,94 (m ; 20H ; 2H6 ; H5 ; H3 ; H2 ; 2Ha ; Hh ; Hc ; H4, 2Hb' ; 2Hn', 2CH₂N) ; 4,18 (m ; 3H ; 2Ha', Hb) ; 4,87 (m ; H1) ; 7,25-7,49 (m ; 10Haro) ; 7,74 (d ; 2Haro)

RMN ¹³C (100 MHz ; MeOD) : δ : 14,45 (Co) ; 17,27 (2Ch') ; 18,71 (2Ch'') ; 21,56 (Cn) ; 23,74 (Cf) ; 27,02 ; 27,77 ; 27,98 ; 30,38 ; 30,41 ; 30,43 ; 30,58 ; 30,60 ; 30,68 ; 30,74 ; 30,77 ; 30,83 ; 31,63 ; 32,94 ; 33,08 (Ci ; Cj ; Ck ; 8Cl ; Cm ; Cg ; 6Cl' ; Cm' ; Co' ; Ci' ; Ci'' ; Cd') ; 37,24 (Ce) ; 39,96 (Ce') ; 43,80 (Cn') ; 50,54 (Cb) ; 55,87 (Cp' ; Cp'') ; 62,79 (C6) ; 70,28 ; 70,67 ; 71,07 ; 71,21 ; 71,64 ; 72,41 ; 72,63 ; 72,91 (Cb' ; Ca ; C2 ; C3 ; C5 ; C4 ; Ch ; Ca') ; 75,88 (Cc) ; 101,17 (C1) ; 111,85 (CH alcène) ; 123,28 (CH alcène) ; 126,34 ; 126,97 ; 128,03 ; 129,09 ; 129,75 ; 129,78 ; 129,86 ; 129,92 ; 130,05 ; 130,12 ; 131,06 ; 132,05 (8CH aro ; 2CH alcène) ; 134,21 ; 135,83 ; 142,48 ; 144,23 ; 146,52 (5Cquat) ; 172,46 ; 175,49 (2C=O ; 2Cq')

HRMS : 1171,8275 g.mol⁻¹ [M]⁺ ; masse exacte : 1171,8244 g.mol⁻¹ [M]⁺

Références bibliographiques

1. Natori, T., Morita, M., Akimoto, K., Koezuka, Y., *Agelasphins, Novel Antitumor and Immunostimulatory Cerebrosides from the Marine Sponge Agelas-Mauritanus*. Tetrahedron, 1994. **50**: p. 2771-2784.
2. Morita, M., Natori, T., Akimoto, K., Osawa, T., Fukushima, H., Koezuka, Y., *Syntheses of α - β -monoglycosylceramides and four diastereoisomers of an α -galactosylceramide*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1995. **5**: p. 699-704.
3. Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., Kaneko, Y., Harada, M., Ogura, N., Akutsu, Y., Motohashi, S., Iizasa, T., Endo, H., Fujisawa, T., Shinkai, H., Taniguchi, M., *Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V α 24 NKT cells*. Cancer Research, 1999. **59**: p. 5102-5105.
4. Tahir, S.M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Bubley, G. J., Wilson, S. B., Balk, S. P., Exley, M. A., *Loss of IFN- γ production by invariant NK T cells in advanced cancer*. Journal of Immunology, 2001. **167**: p. 4046-4050.
5. Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Van Kaer, L., *Opinion - NKT cells: what's in a name?* Nature Reviews Immunology, 2004. **4**: p. 231-237.
6. Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., *An Invariant V-Alpha-24-J-Alpha-Q/V-Beta-11 T-Cell Receptor Is Expressed in All Individuals by Clonally Expanded Cd4-8- T-Cells*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**: p. 1171-1176.
7. Spada, F.M., Koezuka, Y., Porcelli, S.A., *CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**: p. 1529-1534.
8. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**: p. 877-900.
9. Yoshimoto, T., Paul, W.E., *Cd4(Pos), Nk1.1(Pos) T-Cells Promptly Produce Interleukin-4 in Response to in-Vivo. Challenge with anti-CD3*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **179**: p. 1285-1295.
10. Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A., *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells*. Journal of Immunology, 1999. **163**: p. 4647-4650.
11. Godfrey, D.I., Kronenberg, M., *Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**: p. 1379-1388.

12. Mercer, J.C., Ragin, M.J., August, A., *NKT cells: Rapid responders controlling immunity and disease*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2005. **37**: p. 1337-1343.
13. Bendalac, A., Savage, P.B., Teyton, L., *The biology of NKT cells*. Annual Reviews of Immunology, 2007. **25**: p. 297-336.
14. Budd, R.C., Miescher, G.C., Howe, R.C., Lees, R.K., Bron, C., Macdonald, H.R., *Developmentally Regulated Expression of T-Cell Receptor Beta-Chain Variable Domains in Immature Thymocytes*. Journal of Experimental Medicine, 1987. **166**: p. 577-582.
15. Fowlkes, B.J., Kruisbeek, A.M., Tonthat, H., Weston, M.A., Coligan, J.E., Schwartz, R.H., Pardoll, D.M., *A Novel Population of T-Cell Receptor Alpha-Beta-Bearing Thymocytes Which Predominantly Expresses a Single V-Beta Gene Family*. Nature, 1987. **329**: p. 251-256.
16. Ceredig, R., Lynch, F., Newman, P., *Phenotypic Properties, Interleukin-2 Production, and Developmental Origin of a Mature Subpopulation of Lyt-2- L3t4-Mouse Thymocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**: p. 8578-8582.
17. Sykes, M., *Unusual T cell population in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3, CD4-CD8- and $\alpha\beta$ TCR NK1.1 cells*. Journal of Immunology, 1990. **145**: p. 3209-3215.
18. Levitsky, H., Golumbek, P.T., Pardoll, D.M., *The fate of CD4-8- T cell receptor $\alpha\beta$ thymocytes*. Journal of Immunology, 1991. **146**: p. 1113-1117.
19. Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., Tanigushi, M., *Predominant expression of invariant Va14 TCR α -chain in NK1.1 T cell populations*. International Immunology, 1995. **7**: p. 1157-1161.
20. Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, J., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nukugawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M., *CD1d restricted and TCR-Mediated Activation of V α 14 NKT Cells by Glycosylceramides*. Science, 1997. **278**: p. 1626-1629.
21. Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., Roark, J.H., *Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function*. Annual Reviews of Immunology, 1997. **15**: p. 535-562.

22. Hong, S., Scherer, D.C., Singh, N., Mendiratta, S.K., Serizawa, I., Koezuka, Y., Van Kaer, L., *Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice*. Immunological Reviews, 1999. **169**: p. 31-44.
23. Park, S.H., Benlagha, K., Lee, D., Balish, E., Bendelac, A., *Unaltered phenotype tissue distribution and function of $V\alpha 14^+$ NKT cells in germ-free mice*. European Journal Immunology, 2000. **30**: p. 620-625.
24. Godfrey, D.I., Stankovic, S., Baxter, A.G., *Raising the NKT cell family*. Nature Immunology, 2010. **11**: p. 197-206.
25. Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., Carbone, D.P., Paul, W.E., Berzofsky, J.A., *NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway*. Nature Immunology, 2000. **1**: p. 515-520.
26. Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T., Brenner, M.B., *Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **195**: p. 625-636.
27. Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., Bendelac, A., *A thymic precursor to the NKT cell lineage*. Science, 2002. **296**: p. 553-555.
28. Pellicci, D.G., Hammond, K.J., Uldrich, A.P., Baxter, A.G., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., *A Natural Killer T (NKT) cell development pathway involving a thymus-dependent NK1.1-CD4 CD1d-dependent precursor stage*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **195**: p. 835-844.
29. Crowe, N.Y., Uldrich, A.P., Kyparissoudis, K., Hammond, K.J., Hayakawa, Y., Sidobre, S., Keating, R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., *Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NKT cells*. Journal of Immunology, 2003. **171**: p. 4020-4027.
30. Wilson, M.T., Johansson, C., Olivares-Villagómez, D., Singh, A.K., Stanic, A.K., Wang, C.R., Joyce, S., Wick, M.J., Van Kaer, L., *The response of Natural Killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**: p. 10913-10918.
31. Cardell, S., Tangri, S., Chan, S., Kronenberg, M., Benoist, C., Mathis, D., *CD1-restricted CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class-II-deficient mice*. Journal of Experimental Medicine, 1995. **182**: p. 993-1004.

32. Berzofsky, J.A., Terabe, M., *NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis*. Journal of Immunology, 2008. **180**: p. 3627-3635.
33. Terabe, M., Swann, J., Ambrosino, E., Sinha, P., Takaku, S., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Smyth, M.J., Berzofsky, J.A., *A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **202**: p. 1627-1633.
34. Hammond, K.J., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., Randle-Barrett, E., Nakayama, T., Taniguchi, M., Smyth, M.J., van Driel, I.R., Scollay, R., Baxter, A.G., Godfrey, D.I., *NKT cells are phenotypically and functionally diverse*. European Journal of Immunology, 1999. **29**: p. 3768-3781.
35. Eberl, G., Lees, R., Smiley, S.T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., MacDonald, H.R., *Tissue specific segregation of CD1d-dependant and CD1d-independant NKT cells*. Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 6410-6419.
36. Treiner, E., Lantz, O., *CD1d and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men*. Current Opinion of Immunology, 2006. **18**: p. 519-526.
37. Cohen, N.R., Garg, S., Brenner, M.B., *Antigen presentation by CD1d lipids, T cells and NKT cells in microbial immunity*. Advances in Immunology, 2009. **102**: p. 1-94.
38. Uldrich, A.P., Patel, O., Cameron, G., Pellicci, D.G., Day, E.B., Sullivan, L.C., Kyrapissoudis, K., Kjer-Nielsen, L., Vivian, J.P., Cao, B., Brooks, A.G., Williams, S.P., Illarionov, P., Besra, G.S., Turner, S.J., Porcelli, S.A., McCluskey, J., Smyth, M.J., Rossjohn, J., Godfrey, D.I., *A semi-invariant V α 10+ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties*. Nature Immunology, 2011. **12**: p. 616-625.
39. Trombetta, E.S., Mellmann, I., *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**: p. 975-1028.
40. Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., Mellman, I., *Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells*. Nature, 1997. **388**: p. 787-792.
41. Randolph, G.J., Angeli, V., Swartz, M.A., *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nature Review of Immunology, 2005. **5**: p. 617-628.
42. Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J., Steinman, R.M., *The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in*

- addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation.* Journal of Experimental Medicine, 2004. **199**: p. 1607-1618.
43. Banchereau, J., Steinman, R.M., *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature, 1998. **392**: p. 245-252.
 44. Cucak, H., Yrlid, U., Reizis, B., Kalinke, U., Johansson-Lindhom, B., *Type-I interferon signaling in dendritic cells stimulates the development of lymph-node-resident T follicular helper cells.* Immunity, 2009. **31**: p. 491-501.
 45. Robinson, M.J., Sancho, D., Slack, E.C., LeibundGut-Landmann, S., Reis e Sousa, C., *Myeloid C-type lectins in innate immunity.* Nature Immunology, 2006. **12**: p. 1258-1265.
 46. Poeck, H., Wagner, M., Battiany, J., Rothenfusser, S., Wellisch, D., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G., *Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C licence human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help.* Blood, 2004. **103**: p. 3058-3064.
 47. Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A., *A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.* Nature Immunology, 2001. **2**: p. 293-299.
 48. Zajonc, D.M., Cantu, C., Mattner, J., Zhou, D.P., Savage, P.B., Bendelac, A., Wilson, I.A., Teyton, L., *Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor.* Nature Immunology, 2005. **6** p. 810-818.
 49. Vincent, M.S., Gumperz, J.E., Brenner, M.B., *Understanding the function of CD1-restricted T cells.* Nature Immunology, 2003. **4**: p. 517-523.
 50. Brigl, M., Brenner, M.B., *CD1 : Antigen presentation and T cell function.* Annual Reviews of Immunology, 2004. **22**: p. 817-890.
 51. Barral, D.C., Brenner, M.B., *CD1 antigen presentation : how it works.* Nature Reviews of Immunology, 2007. **12**: p. 929-941.
 52. Reddy, B.G., Silk, J.D., Salio, M., Balamurugan, R., Shepherd, D., Ritter, G., Cerundolo, V., Schmidt, R.R. , *Nonglycosidic agonists of invariant NKT cells for use as vaccine adjuvants* ChemMedChem, 2009. **4** p. 171-175.
 53. Pál, E., Tabira, T., Kawano, T., Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., *Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NKT cells.* Journal of Immunology, 2001. **166**: p. 662-668.
 54. Schwartz, R.H., *T cell anergy.* Annual Review of Immunology, 2003. **21**: p. 305-334.

55. Jenkins, M.K., Schwartz, R.H., *Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo*. Journal of Experimental Medicine, 1987. **165**: p. 302-319.
56. Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C., Rao, A., *Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance*. Cell, 2002. **109**: p. 719-732.
57. Zheng, Y., Zha, Y., Gajewski, T.F., *Molecular regulation of T-cell anergy*. European Molecular Biology Organization, 2008. **9**: p. 50-55.
58. Zheng, Y., Collins, S.L., Lutz, M.A., Allen, A.N., Kole, T.P., Zarek, P.E., Powell, J.D., *A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy*. Journal of Immunology, 2007. **178**: p. 2163-2170.
59. Chappert, P., Schwartz, R.H., *Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance*. Current Opinion in Immunology, 2010. **22**: p. 552-559.
60. Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Raimondi, G., *Immunoregulatory functions of mTOR inhibition*. Nature Reviews of Immunology, 2009. **9**: p. 324-337.
61. Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M., Steinman, R.M., *Prolonged IFN- γ producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded DCs*. Nature Immunology, 2002. **3**: p. 867-874.
62. Parekh, V.V., Wilson, T.T., Olivares-Villagomez, D., Singh, A.K., Wu, L., Wang, C.R., Joyce, S., Van Kaer, L., *Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**: p. 2572-2583.
63. Thapa, P., Zhang, G., Xia, C., Gelbard, A., Overwijk, W.W., Liu, C., Hwu, P., Chang, D.Z., Courtney, A., Sastry, J.K., Wang, P.G., Li, C., Zhou, D., *Nanoparticle formulated alpha-galactosylceramide activates NKT cells without inducing anergy*. Vaccine, 2009. **27**: p. 3484-3488.
64. Motoki, K., Kobayashi, E., Uchida, T., Fukushima, H., Koezuka, Y., *Antitumor Activities of Alpha-Monogalactosylceramides, Beta-Monogalactosylceramides and 4 Diastereomers of an Alpha-Galactosylceramide*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1995. **5**: p. 705-710.
65. Gumperz, J.E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S.A., Cardell, S., Brenner, M.B., Behar, S.M., *Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids*. Immunity 2000. **12**: p. 211-221.
66. Fox, L.M., Cox, D.G., Lockridge, J.L., Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D.L., Ndonye, R.M., Veerapen, N., Besra, G.S., Howell, A.R., Cook, M.E., Adams, E.J.,

- Hildebrand, W.H., Gumperz, J.E., *Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes*. PLoS Biology, 2009. **7**: p. e1000228.
67. Adlercreutz, A., Weadge, J.T., Petersen, B.O., Duus, J., Dovichi, N.J., Palcic, M.M., *Enzymatic synthesis of iGb3 and Gb3 ceramides*. Carbohydrate Research, 2010. **345**: p. 1384-1388.
 68. Zhou, D., Mattner, J., Ill, C.C., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y., Yamashita, M., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R.L., Levery, S.B., Savage, P.B., Teyton, L., Bendelac, A., *Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT cell*. Science, 2004. **306**: p. 1786-1789.
 69. Stanic, A.K., De Silva, A.D., Park, J.J., Sriram, V., Ichikawa, S., Hirabayashi, Y., Hawakana, K., Van Kaer, L., Brutkiewicz, R.R., Joyce, S., *Defective presentation of CD1d 1-restricted natural V α 14J α 18 NKT lymphocyte antigen caused by β -D-glucosylceramide synthase deficiency*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**: p. 1849-1854.
 70. Li, Y., Teneberg, S., Thapa, P., Bendelac, A., Levery, S.B., Zhou, D., *Sensitive detection of isoglobo and globo series tetrahexosylceramides in human thymus by ion trap mass spectrometry*. Glycobiology, 2008. **18**: p. 158-165.
 71. Jahng, A., Maricic, I., Aguilera, C., Cardell, S., Halder, R.C., Kumar, V., *Prevention of autoimmunity by targeting a distinct noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide*. Journal of Experimental Medicine, 2004. **199**: p. 947-957.
 72. Fisher, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S.H., Schaible, U.E., *Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: p. 10685-10690.
 73. Venkataswamy, M.M., Porcelli, S.A., *Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted Natural Killer T cells*. Seminar in Immunology, 2009. **22**: p. 68-78.
 74. Lotter, H., Gonzalez-Roldan, N., Lindner, B., Winau, F., Isibasi, A., Moreno-Lafont, M., Ulmer, A.J., Holst, O., Tannich, E., Jacobs, T., *Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from Entamoeba histolytica are critically important to control amebic liver abscess*. PloS Pathogens, 2009. **5**: p. e1000434.
 75. Koch, M., Stronge, V.S., Shepherd, D., Mathew, B., Ritter, G., Fersht, A.R., Besra, G.S., Schmidt, R.R., Jones, E.Y., Cerundolo, V., *The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide*. Nature Immunology, 2005. **6**: p. 819-826.

76. Wu, D., Zajonc, D.M., Fujio, M., Sullivan, B.A., Kinjo, Y., Kronenberg, M., Wilson, I.A., Wong, C.-H., *Design of natural killer T cell activators : structure and function of a microbial glycosphingolipid bound to mouse CD1d*. Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America, 2006. **103**: p. 3972-3977.
77. Iijima, H., Kimura, K., Uchimura, A., Shimizu, T., Ueno, H., Natori, T., Koezuka, Y., *Structure-activity relationship and conformational analysis of monoglycosylceramides on the syngeneic mixed leukocyte reaction*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1998. **6**: p. 1905-1910.
78. Gupta, R., et al., *Indian task force for celiac disease: current status*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(48): p. 6028-33.
79. Veerapen, N., Reddington, F., Bricard, G., Porcelli, S.A., Besra, G.S., *Synthesis and biological activity of α -L-fucosyl ceramides, analogues of the potent agonist, α -D-galactosyl ceramide KRN7000*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**: p. 3223-3226.
80. Barbieri, L., Costantino, V., Fatorusso, E., Mangoni, A., Basilico, N., Mondani, M., Taramelli, D., *Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of 2'-fluoro-2'-deoxy- α -galactosylceramide and an Evaluation of Its Immunostimulating Properties*. European Journal of Organic Chemistry, 2005. **15**: p. 3279-3285.
81. Veerapen, N., Brigl, M., Garg, S., Cerundolo, V., Cox, L.R., Brenner, M.B., Besra, G.S., *Synthesis and biological activity of α -galactosyl ceramide KRN7000 and galactosyl (α 1-2) galactosyl ceramide*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**: p. 4288-4291.
82. Raju, R., Castillo, B.F., Richardson, S.K., Thakur, M., Severins, R., Kronenberg, M., Howell, A.R., *Synthesis and evaluation of 3''-and 4''-deoxy and -fluoro analogs of the immunostimulatory glucolipid, KRN7000*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**: p. 4122-4125.
83. Xia, C., Zhang, W., Zhang, Y., Chen, W., Nadas, J., Severin, R., Woodward, R., Wang, B., Wang, X., Kronenberg, M., Wang, P.G., *The roles of 3' and 4' hydroxy groups in α -galactosylceramide stimulation of invariant natural killer T cells*. ChemMedChem, 2009. **4**: p. 1810-1815.
84. Xing, G.-W., Wu, D., Poles, M.A., Horowitz, A., Tsuji, M., Ho, D.D., Wong, C.-H., *Synthesis and human NKT cell stimulating properties of 3-O-sulfo- α /b-*

- galactosylceramides*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **13**: p. 2907-2916.
85. Zhang, W., Xia, C., Nadas, J., Chen, W., Gu, L., Wang, P.G., *Introduction of aromatic group on 4'-OH of α -GalCer manipulated NKT cell cytokine production*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2010. **19**: p. 2767-2776.
 86. Ebensen, T., Link, C., Riese, P., Schulze, K., Morr, M., Guzman, C.A., *A Pegylated derivative of α -Galactosylceramide exhibits improved biological properties*. *The Journal of Immunology*, 2007. **179**: p. 2065-2073.
 87. Zhou, X.-T., Forestier, C., Goff, R.D., Li, C., Teyton, L., Bendelac, A., Savage, P.B., *Synthesis and NKT cell stimulating properties of fluorophore- and biotin-appended 6''-amino-6''-deoxy-galactosylceramides*. *Organic Letters*, 2002. **4**: p. 1267-1270.
 88. Tashiro, T., Nakagawa, R., Inoue, S., Shiozaki, M., Watarai, H., Taniguchi, M., Mori, K., *RCAI-61 the 6'-O-methylated analog of KRN7000 : its synthesis and potent bioactivity for mouse lymphocytes to produce interferon- γ in vivo*. *Tetrahedron Letters*, 2008. **49**: p. 6827-6830.
 89. Trappeniers, M., Van Beneden, K., Decruy, T., Hillaert, U., Linclau, B., Elewaut, D., Van Calenbergh, S., *6'-derivatised α -GalCer analogues capable of inducing strong CD1d-mediated Th1-biased NKT cell responses in mice*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**: p. 16468-16469.
 90. Aspeslagh, S., Li, Y., Dawen Yu, E., Pauwels, N., Trappeniers, M., Girardi, E., Decruy, T., Van Beneden, K., Venken, K., Drennan, M., Leybaert, L., Wang, J., Franck, R.W., Van Calenbergh, S., Zajonc, D.M., Elewaut, D., *Galactose modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumor metastasis*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 2011. **30**: p. 2294-2305.
 91. Tashiro, T., Nakagawa, R., Hirokawa, T., Inoue, S., Watarai, H., Taniguchi, M., Mori, K., *RCAI-56, a carboxylic analogue of KRN7000 : its synthesis and potent activity for natural (NK) T cells to preferentially produce interferon- γ* . *Tetrahedron Letters*, 2007. **48**: p. 3343-3347.
 92. Tashiro, T., Nakagawa, R., Hirokawa, T., Inoue, S., Watarai, H., Taniguchi, M., Mori, K., *RCAI-37, 56, 59, 60, 92, 101, and 102, cyclitol and carbasugar analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009. **17**: p. 6360-6373.

93. Morshed, S.R., Takahashi, T., Savage, P.B., Kambham, N., Strober, S., *Beta-galactosylceramide alters invariant natural killer T cell function and is effective treatment for lupus*. Clinical Immunology, 2009. **132**: p. 321-333.
94. Tomiyama, H., Yanagisawa, T., Nimura, M., Noda, A., Tomiyama, T., *JP 2001/354666*, 2002. Chemical Abstract, 2002. **136**: p. 37901x.
95. Schmieg, J., Yang, G., Franck, R.W., Tsuji, M., *Superior protection against Malaria and Melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand α -galactosylceramide*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **198**: p. 1631-1641.
96. Yang, G., Schmieg, J., Tsuji, M., Franck, R.W., *The C-glycoside analogue of the immunostimulant α -galactosylceramide (KRN7000) : synthesis and striking enhancement of activity*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**: p. 3818-3822.
97. Franck, R.W., Tsuji, M., *α -C-galactosylceramides: synthesis and immunology*. Accounts of Chemical Research, 2006. **39**: p. 692-701.
98. Li, X., Shiratsuchi, T., Chen, G., Dellabona, P., Casorati, G., Franck, R.W., Tsuji, M., *Invariant TCR rather than CD1d shapes the preferential activities of C-glycoside analogues against human versus murine invariant NKT cells*. The Journal of Immunology, 2009. **183**: p. 4415-4421.
99. Lu, X., Song, L., Metelitsa, L.S., Bittman, R., *Synthesis and evaluation of an α -C-galactosylceramide analogue that induces Th1-biased responses in human natural killer T cells*. ChemBioChem, 2006. **7**: p. 1750-1756.
100. Dere, R.T., Zhu, X., *The first synthesis of a thioglycoside analogue of the immunostimulant KRN7000*. Organic Letters, 2008. **10**: p. 4641-4644.
101. Blauvelt, M.L., Khalili, M., Jaung, W., Paulsen, J., Anderson, A.C., Brian-Wilson, S., Howell, A.R., *α -S-GalCer: synthesis and evaluation for iNKT cell stimulation*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**: p. 6374-6376.
102. Chang, Y.-J., Huang, J.-R., Tsai, Y.-C., Hung, J.-T., Wu, D., Fujio, M., Wong, C.-H., Yu, A.L., *Potent immune-modulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**: p. 10299-10304.
103. Hogan, A.E., O'Reilly, V., Dunne, M.R., Dere, R.T., Zeng, S.G., O'Brien, C., Amu, S., Fallon, P.G., Exley, M.A., O'Farrelly, C., Zhu, X., Doherty, D.G., *Activation of*

- human invariant natural killer T cells with a thioglycoside analogue of α -galactosylceramide*. Clinical Immunology, 2011. **Article in Press**.
104. Harrak, Y., Barra, C.M., Delgado, A., Castano, A.R., Llebaria, A., *Galacto-Configured Aminocyclitol Phytoceramides are potent in vivo invariant Natural Killer T cell stimulators*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**: p. 12079-12084.
 105. Lee, T., Cho, M., Ko, S-Y., Youn, H-J., Baek, D.J., Cho, W-J., Kang, C-Y., Kim, S., *Synthesis and evaluation of 1,2,3 triazole containing analogues of immunostimulant α -GalCer*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**: p. 585-589.
 106. Fuhshuku, K., Hongo, N., Tashiro, T., Masuda, Y., Nakagawa, R., Seino, K., Taniguchi, M., Mori, K., *RCAI-8, 9, 18,19 and 49-52, conformationally restricted analogues of KRN7000 with an azetidine or a pyrrolidine ring : their synthesis and bioactivity for mouse natural killer T cells to produce cytokines*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008. **16**: p. 950-964.
 107. Shiozaki, M., Tashiro, T., Koshino, H., Nakagawa, R., Inoue, S., Shigeura, T., Watarai, H., Taniguchi, M., Mori, K., *Synthesis and biological activity of ester and ether analogues of α -galactosylceramide (KRN7000)*. Carbohydrate Research, 2010. **345**: p. 1663-1684.
 108. Trappeniers, M., Chofor, R., Aspelagh, S., Li, Y., Linclau, B., Zajonc, D.M., Elewaut, D., Van Calenbergh, S., *Synthesis and evaluation of amino-modified α -GalCer analogues*. Organic Letters, 2010. **12**: p. 2928-2931.
 109. Goff, R.D., Gao, Y., Mattner, J., Zhou, D., Yin, N., Cantu, C., Teyton, L., Bendelac, A., Savage, P.B., *Effects of lipids chain lengths in α -Galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells*. Journal of American Chemical Society, 2004. **126**: p. 13602-13603.
 110. Yu, K.A.O., Im, J.S., Molano, A., Dutronc, Y., Illiaronov, P.A., Forestier, C., Fujiwara, N., Arias, I., Miyake, S., Yamamura, T., Chang, Y-T., Besra, G.S., Porcelli, S.A., *Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -Galactosylceramides*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**: p. 3383-3388.
 111. Velmourougane, G., Raju, R., Bricard, G., Im, J.S., Besra, G.S., Porcelli, S.A., Howell, A.R., *Synthesis and evaluation of an acyl-chain unsaturated analog of the*

- Th2 biasing, immunostimulatory glycolipid*, OCH. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**: p. 3386-3388.
112. Fujio, M., Wu, D., Garcia-Navarro, R., Ho, D.D., Tsuji, M., Wong, C-H., *Structure-based discovery of glycolipids for CD1d-mediated NKT cell activation: tuning the adjuvant versus immunosuppression activity*. Journal of American Chemical Society, 2006. **128**: p. 9022-9023.
 113. Chang, Y.-J., Huang, J-R., Tsai, Y-C., Hung, J-T., Wu, D., Fujio, M., Wong, C-H., Lu, A.L., *Potent immuno-modulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**: p. 10299-10304.
 114. Liang, P.-H., Imamura, M., Li, X., Wu, D., Fujio, M., Guy, R.T., Wu, B-C., Tsuji, M., Wong, C-H., *Quantitative microarray analysis of intact glycolipid-CD1d interaction and correlation with cell-based cytokine production*. Journal of American Chemical Society, 2008. **130**: p. 12348-12354.
 115. Park, J.-J., Lee, J.H., Seo, K-C., Bricard, G., Venkataswamy, M.M., Porcelli, S.A., Chung, S-K., *Synthesis and biological activities of KRN7000 analogues having aromatic residues in acyl and backbone chain with varying stereochemistry*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**: p. 814-818.
 116. Lee, Y.-S., Lee, K-A., Lee, J-Y., Kang, M-H., Song, Y.C., Baek, D.J., Kim, S., Kang, C-Y., *An α -GalCer analogue with branched acyl chain enhances protective immune responses in a nasal influenza vaccine*. Vaccine, 2010. **29**: p. 417-425.
 117. Ndonge, R.M., Izmirian, D.P., Dunn, M.F., Yu, K.O., Porcelli, S.A., Khurana, A., Kronenberg, M., Richardson, S.K., Howell, A.R., *Synthesis and evaluation of sphinganine analogues of KRN7000 and OCH*. Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**: p. 10260-10270.
 118. Miyamoto, K., Miyake, S., Yamamura, T., *A synthetic glycolipids prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells*. Nature, 2001. **413**: p. 531-534.
 119. Michieletti, M., Bracci, A., Compostella, F., De Libero, G., Mori, L., Fallarini, S., Lombardi, G., Panza, L., *Synthesis of α -galactosyl ceramide (KRN7000) and analogues thereof via a common precursor and their preliminary biological assessment*. Journal of Organic Chemistry Note, 2008. **73**: p. 9192-9195.
 120. Borg, N.A., Wun, K.S., Kjer-Nielsen, L., Wilce, M.C.J., Pellicci, D.G., Koh, R., Besra, G.S., Bharadwaj, M., Godfrey, D.I., McCluskey, J., Rossjohn, J., *CD1d-lipid-*

- antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor*. Nature Immunology, 2007. **448**: p. 44-49.
121. Rissoan, M.-C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.-J., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**: p. 1183-1186.
 122. Schmieg, J., Yang, G., Franck, R.W., Van Rooijen, N., Tsuji, M., *Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependant fashion*. Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America, 2005. **102**: p. 1127-1132.
 123. Liang, M.T., Davies, N.M., Blanchfield, J.T., Toth, I., *Particulate systems as adjuvants and carriers for peptide and protein antigens*. Current Drug Delivery, 2006. **4**: p. 379-388.
 124. Mufamadi, M.S., Pillay, V., Choonara, Y.E., Du Toit, L.C., Modi, G., Naidoo, D., Ndesendo, V.M.K., *A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery*. Journal of Drug Delivery, 2009. **Article ID 939851**: p. doi:10.1155/2011/939851.
 125. Koo, O.M., Rubinstein, I., Onyuksel, H., *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. Nanomedicine, 2005. **1**: p. 193-212.
 126. Muller, R.H., Mader, K., Gohla, S., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**: p. 161-177.
 127. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Venier-Julienne, M. C., Proust, J.E., Phan-Tan-Luu, R., Benoit, J.P., *The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **18**: p. 55-61.
 128. Baillie, A.J., Florence, A.T., Hume, L.R., Muirhead, G.T., Rogerson, A., *The preparation and properties of niosomes--non-ionic surfactant vesicles*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1985. **37**: p. 863-868.
 129. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P., *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1979. **31**: p. 331-332.
 130. Vinogradov, S.V., Bronich, T.K., Kabanov, A.V., *Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. 135-147.

131. Boas, U., Heegaard, P.M., *Dendrimers in drug research*. Chemical Society Reviews, 2004. **33**: p. 43-63.
132. Cheon, J., Lee, J.H., *Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology*. Accounts of Chemical Research, 2008. **41**: p. 1630-1640.
133. Liu, Y.L., Shipton, M.K., Ryan, J., Kaufman, E.D., Franzen, S., Feldheim, D.L., *Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide–Poly(ethylene glycol) Monolayers*. Analytical Chemistry, 2007. **79**: p. 2221-2229.
134. Iijima, S., Ajayan, P.M., Ichihashi, T., *Growth model for carbon nanotubes*. Physical Review Letters, 1992. **69**: p. 3100-3103.
135. Wick, P., Clift, M.J., Rosslein, M., Rothen-Rutishauser, B., *A brief summary of carbon nanotubes science and technology: a health and safety perspective*. ChemSusChem, 2011. **4**: p. 905-911.
136. Storm, G., Crommelin, D.J.A., *Liposome: quo vadis ?* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**: p. 19-31.
137. Gabizon, A., Papahadjopoulos, D., *Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**: p. 6949-6953.
138. Allen, T.M., *Stealth liposomes avoiding reticuloendothelial uptake in Liposome in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1989: p. 405-415.
139. Sharma, S., Sharma, N., Kumar, S., Gupta, G.D., *Liposome : A review*. Journal of Pharmacy Research, 2009. **7**: p. 1163-1167.
140. Kamijuku, H., Nagata, Y., Jiang, X., Ichinohe, T., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, M., Hase, K., Ohno, H., Shimaoka, T., Yonehara, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H., Seino, K.I., *Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses*. Mucosal Immunology, 2008. **1**: p. 208-218.
141. Veerapen, N., Reddington, F., Salio, M., Cerundolo, V., Besra, G.S., *Synthesis of truncated analogues of the iNKT cell agonist, alpha-galactosyl ceramide (KRN7000), and their biological evaluation*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2011. **19**: p. 221-228.
142. Cheng, J.M., Chee, S.H., Knight, D.A., Acha-Orbea, H., Hermans, I.F., Timmer, M.S., Stocker, B.L., *An improved synthesis of dansylated alpha-galactosylceramide and its*

- use as a fluorescent probe for the monitoring of glycolipid uptake by cells. Carbohydrate Research, 2011. **346**: p. 914-926.
143. Ndakala, A.J., Hashemzadeh, M., So, R.C., Howell, A.R., *Synthesis of D-erythro-dihydrosphingosine and D-xylo-phytosphingosine from a serine-derived 1,5-dioxaspiro[3.2]hexane template*. Organic Letters, 2002. **4**: p. 1719-1722.
144. Garner, P., Park, J.M., *The synthesis and configurational stability of differentially protected beta-Hydroxy-alpha-amino aldehydes*. Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**: p. 2361-2364.
145. Azuma, H., Tamagaki, S., Ogino, K., *Stereospecific total syntheses of sphingosine and its analogues from L-serine*. Journal of Organic Chemistry, 2000. **65**: p. 3538-3541.
146. Veerapen, N., Leadbetter, E.A., Brenner, M.B., Cox, L.R., Besra, G.S., *Synthesis of a novel alpha-galactosyl ceramide haptenated-lipid antigen, a useful tool in demonstrating the involvement of iNKT cells in the production of antilipid antibodies*. Bioconjugate Chemistry, 2010. **21**: p. 741-747.
147. Crich, D., Cai, F., Yang, F., *A stable, commercially available sulfenyl chloride for the activation of thioglycosides in conjunction with silver trifluoromethanesulfonate*. Carbohydrate Research, 2008. **343**: p. 1858-1862.
148. Figueroa-Perez, S., Schmidt, R.R., *Total synthesis of alpha-galactosyl cerebroside*. Carbohydrate Research, 2000. **328**: p. 95-102.
149. Plettenburg, O., Bodmer-Narkevitch, V., Wong, C.H., *Synthesis of alpha-galactosyl ceramide, a potent immunostimulatory agent*. Journal of Organic Chemistry, 2002. **67**: p. 4559-4564.
150. Nicolaou, K.C., Dolle, R.E., Papahatjis, D.P., and Randall, J.L., *Practical synthesis of oligosaccharides. Partial synthesis of avermectin Bla*. Journal of American Chemical Society, 1984. **106**: p. 4189-4192.
151. Morita, M., Motoki, K., Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E., Fukushima, H., *Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice*. Journal of Medicinal Chemistry, 1995. **38**: p. 2176-2187.
152. Hadd, M.J., Gervay, J., *Glycosyl iodides are highly efficient donors under neutral conditions*. Carbohydrate Research, 1999. **320**: p. 61-69.
153. Lemieux, R.U., Hendricks, K.B., Stick, R.V., James, K., *Halide Ion Catalyzed Glycosidation Reactions. Syntheses of alpha-linked Disaccharides*. Journal of American Chemical Society, 1975. **97**: p. 4056-4062.

154. Toba, T., Murata, K., Nakanishi, K., Takahashi, B., Takemoto, N., Akabane, M., Nakatsuka, T., Imajo, S., Yamamura, T., Miyake, S., Annoura, H., *Minimum structure requirement of immunomodulatory glycolipids for predominant Th2 cytokine induction and the discovery of non-linear phytosphingosine analogs*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**: p. 2781-2784.
155. Sakai, T., Ehara, H., Koezuka, Y., *Synthesis of NBD- α -galactosylceramide and its immunologic properties*. Organic Letters, 1999. **1**: p. 359-361.
156. Vo-Hoang, Y., Micouin, L., Ronet, C., Gachelin, G., Bonin, M., *Total enantioselective synthesis and in vivo biological evaluation of a novel fluorescent BODIPY α -galactosylceramide*. ChemBioChem, 2003. **4**: p. 27-33.
157. Dubreuil, D., Pipelier, M., Micouin, L., Lecourt, T., Lacone, V., Bonneville, M., Lependu, J., Turcot-Dubois, A.-L., (WO2008047174A1) *Alpha-Galactosylceramide analogs, their methods of manufacture, intermediate compounds useful in these methods, and pharmaceutical compositions containing them*, W.I.P. Organization, Editor. 2008. p. 1-113.
158. Ren, C.-T., Tsai, Y.-H., Yang, Y.-L., Zou, W., Wu, S.-H., *Synthesis of a Tetrasaccharide Glycosyl Glycerol. Precursor to Glycolipids of Meiothermus taiwanensis ATCC BAA-400*. Journal of Organic Chemistry, 2007. **72**: p. 5427-5430.
159. Szabo, Z.A., Herczeg, M., Fekete, A., Batta, G., Borbas, A., Liptak, A., Antus, S., *Synthesis of three regioisomers of the pentasaccharide part of the Skp1 glycoprotein of Dictyostelium discoideum*. Tetrahedron : Asymmetry, 2009. **20**: p. 808-820.
160. Upadhyay, P.K., Kumar, P., *A Concise synthesis of (2S,3S,4S)-2-(Hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (LAB1)*. Synthesis, 2010. **18**: p. 3063-3066.
161. Sharpless, K.B., Amberg, W., Bennani, Y.L., Crispino, G.A., Hartung, J., Jeong, K.-S., Kwong, H.-L., Morikawa, K., Wang, Z.-M., Xu, D., Zhang, X.-L., *The Osmium-Catalysed Asymmetric Dihydroxylation : A New Ligand Class and a Process Improvement*. Journal of Organic Chemistry, 1992. **57**: p. 2768-2771.
162. Ishikawa, T., Fletcher, H.G.Jr., *The synthesis and solvolysis of some D-glucopyranosyl bromides having a benzyl group at C-2*. Journal of Organic Chemistry, 1969. **34**: p. 563-571.
163. Paget, C., Mallevaey, T., Speak, A.O., Torres, D., Fontaine, J., Sheehan, K.C., Capron, M., Ryffel, B., Favéeuw, C., Leite de Moraes, M., Platt, F., Trottein, F., *Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids*. Immunity, 2007. **27**: p. 597-609.

164. Bialecki, E., Macho Fernandez, E., Ivanov, S., Paget, C., Fontaine, J., Rodriguez, F., Lebeau, L., Ehret, C., Frisch, B., Trottein, F., Faveeuw, C., *Spleen-Resident CD4 and CD4 CD8alpha Dendritic Cell Subsets Differ in Their Ability to Prime Invariant Natural Killer T Lymphocytes*. PLoS One, 2011. **6**: p. e26919.
165. Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D., *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*. Biochimica et Biophysica Acta, 1979. **557**: p. 9-23.
166. Szoka, F.J., Papahadjopoulos, D., *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**: p. 4194-4198.
167. Corpet, D.E., Parnaud, G., Delverdier, M., Peiffer, G., Tache, S., *Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens*. Cancer Research, 2000. **60**: p. 3160-3164.
168. Gupta, A.K., Curtis, A.S., *Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture*. Journal of Materials Sciences, 2004. **15**: p. 493-496.
169. Uster, P.S., Allen, T. M., Daniel, B. E., Mendez, C. J., Newman, M. S., Zhu, G. Z., *Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time*. FEBS Letters, 1996. **386**: p. 243-246.
170. Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C. and et al., *Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**: p. 11460-11464.
171. Dos Santos, N., Allen, C., Doppen, A-M., Anantha, M., Cox, K.A.K., Gallagher, R.C., Karlsson, G., Edwards, K., Kenner, G., Samuels, L., Webb, M.S., Bally, M.B., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. Biochimica et Biophysica-Acta, 2007. **1768**: p. 1367-1377.
172. Espuelas, S., Thumann, C., Heurtault, B., Schuber, F., Frisch, B., *Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes*. Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**: p. 2385-2393.

173. Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., *The mannose receptor : linking homeostasis and immunity through sugar recognition*. Trends in Immunology, 2005. **26**: p. 104-110.
174. Napper, C.E., Drickamer, K., Taylor, M.E., *Collagen binding by the mannose receptor mediated through the fibronectin type II domain*. Biochemical Journal, 2006. **395**: p. 579-586.
175. Sallusto, M.A., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down regulation by cytokines and bacterial products*. Journal of Experimental Medicine, 1995. **182**: p. 389-400.
176. Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., Pieters, J., *The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells*. European Journal of Immunology, 1997. **27**: p. 2417-2425.
177. Ingalls, R.R., Golenbock, D.T., *CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide*. Journal of Experimental Medicine, 1995. **181**: p. 1473-1479.
178. Castro, F.V.V., Tutt, A.L., White, A.L., Teeling, J.L., James, S., French, R.R., Glennie, M.J. , *CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses*. European Journal of Immunology, 2008. **38**: p. 2263-2273.
179. Ihanus, E., Uotila, L.M., Toivanen, A., Varis, M., Gahmberg, C.G., *Red cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4*. Blood, 2007. **109**: p. 802-810.
180. van Broekhoven, C.L., Parish, C.R., Demangel, C., Britton, W.J., Altin, J.G., *Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of anti-tumor immunity and for tumor immunotherapy*. Cancer Research, 2004. **64**: p. 4357-4365.
181. Janeway, C.A.J., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1989. **54**: p. 1-13.
182. Blasius, A.L., Beutler, B., *Intracellular toll-like receptors*. Immunity, 2010. **32**: p. 305-315.
183. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**: p. 783-801.

184. Roth, A., Espuelas, S., Thumann, C., Frisch, B., Schubert, F., *Synthesis of thiol-reactive lipopeptide adjuvants. Incorporation into liposomes and study of their mitogenic effect on mouse splenocytes*. Bioconjugate Chemistry, 2004. **15**: p. 541-553.
185. Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., Carbone, F.R., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. Cell, 1994. **76**: p. 17-27.
186. Dos Santos, N., Allen, C., Doppen, A.M., Anantha, M., Cox, K.A., Gallagher, R.C., Karlsson, G., Edwards, K., Kenner, G., Samuels, L., Webb, M.S., Bally, M.B., *Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding*. Biochimica and Biophysica Acta, 2007. **1768**: p. 1367-1377.
187. Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., *The biology of NKT cells*. Annual Review of Immunology, 2007. **25**: p. 297-336.
188. Thomann, J.S., Heurtault, B., Weidner, S., Braye, M., Beyrath, J., Fournel, S., Schubert, F., Frisch, B., *Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting*. Biomaterials, 2011. **32**: p. 4574-4783.
189. Dufresne, I., Desormeaux, A., Bestman-Smith, J., Gourde, P., Tremblay, M.J., Bergeron, M.G., *Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-DR Fab' fragments*. Biochimica et Biophysica Acta, 1999. **1421**: p. 284-294.
190. van Broekhoven, C.L., Parish, C.R., Demangel, C., Britton, W.J., Altin, J.G., *Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy*. Cancer Research, 2004. **64**: p. 4357-4365.
191. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**: p. 740-745.
192. Heurtault, B., Gentile, P., Thomann, J.S., Baehr, C., Frisch, B., Pons, F., *Design of a liposomal candidate vaccine against Pseudomonas aeruginosa and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**: p. 276-285.
193. Ignatius, R., Mahnke, K., Rivera, M., Hong, K., Isdell, F., Steinman, R.M., Pope, M., Stamatatos, L., *Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes*

- by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood*, 2000. **96**: p. 3505-3513.
194. Taneichi, M., Tanaka, Y., Kakiuchi, T., Uchida, T., *Liposome-coupled peptides induce long-lived memory CD8 T cells without CD4 T cells*. *PLoS One*, 2010. **5**: p. e15091.
 195. Macho Fernandez, E., Chang, J., Fontaine, J., Bialecki, E., Rodriguez, F., Werkmeister, E., Krieger, V., Ehret, C., Heurtault, B., Fournel, S., Frisch, B., Betbeder, D., Faveeuw, C., Trottein, F., *Activation of invariant Natural Killer T lymphocytes in response to the alpha-galactosylceramide analogue KRN7000 encapsulated in PLGA-based nanoparticles and microparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. **423**: p. 45-54.
 196. Stirnemann, K., Romero, J.F., Baldi, L., Robert, B., Cesson, V., Besra, G.S., Zauderer, M., Wurm, F., Corradin, G., Mach, J.P., Macdonald, H.R., Donda, A., *Sustained activation and tumor targeting of NKT cells using a CD1d-anti-HER2-scFv fusion protein induce antitumor effects in mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2008. **118**: p. 994-1005.
 197. Iyoda, T., Ushida, M., Kimura, Y., Minamino, K., Hayuka, A., Yokohata, S., Ehara, H., Inaba, K., *Invariant NKT cell anergy is induced by a strong TCR-mediated signal plus co-stimulation*. *International Immunology*, 2010. **22**: p. 905-913.
 198. Chang, W.S., Kim, J.Y., Kim, Y.J., Kim, Y.S., Lee, J.M., Azuma, M., Yagita, H., Kang, C.Y., *Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy*. *Journal of Immunology*, 2008. **181**: p. 6707-6710.
 199. Parekh, V.V., Lalani, S., Kim, S., Halder, R., Azuma, M., Yagita, H., Kumar, V., Wu, L., Kaer, L.V., *PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells*. *Journal of Immunology*, 2009. **182**: p. 2816-2826.
 200. Rouser, G., Fkeischer, S., Yamamoto, A., *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. *Lipids*, 1970. **5**: p. 494-496.
 201. Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T., Tanimizu, I., *A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids*. *Clinica Chimica Acta*, 1977. **79**: p. 93-98.

202. Bohlen, P., Stein, S., Dairman, W., Udenfriend, S., *Fluorometric assay of proteins in the nanogram range*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973. **155**: p. 213-220.

Synthèse de nouveaux ligands du récepteur CD1d : applications à la vaccination anti-tumorale

L'objectif de cette thèse a été d'optimiser la réponse immunitaire anti-tumorale induite par les cellules dendritiques (DC) et les cellules iNKTs, en réponse à la prise en charge du KRN7000 (α -galactosyl-céramide) par la molécule CD1d située sur les DCs. Le premier axe de travail visait à synthétiser de nouveaux analogues du KRN7000, en fonctionnalisant la position C6 du sucre et en greffant un groupement phényle sur l'une des chaînes grasses. Les études *in vitro* ont montré que les modifications apportées par rapport au KRN7000 n'ont pas altéré la prise en charge des molécules obtenues par les DCs. Dans tous les cas, une sécrétion de cytokines a pu être observée. Des études complémentaires visant à décrire le profil cytokinique *in vivo* sont en cours. Le second axe a consisté en la mise au point d'une stratégie de vectorisation du KRN7000 afin de favoriser sa présentation aux DCs, en l'associant à des molécules d'intérêt comme un peptide spécifique d'une tumeur, une molécule de ciblage des DCs ou des ligands des TLRs. Dans les conditions utilisées, le phénomène d'anergie induit classiquement par l'administration répétée du KRN7000 n'a pas pu être levé. Cependant, nous avons montré d'une part que le KRN7000 vectorisé dans les liposomes est toujours pris en charge par les cellules dendritiques, et d'autre part qu'une réponse immunitaire se traduisant par la production de cytokines par les cellules iNKTs est induite.

Mots clés : α -galactosyl-céramide - cellules dendritiques - cellules iNKTs - vectorisation – ciblage des cellules dendritiques - liposomes

The aim of this project was to optimize the anti-tumor immune response induced by dendritic and iNKTs cells, in response to KRN7000 (α -galactosyl-ceramide), which interacts with CD1d molecule situated on DCs. At first we synthesized new analogues of KRN7000, by functionalizing the C6 position of the carbohydrate moiety and by grafting a phenyl group on one of the fatty chain. *In vitro* studies indicated that chemical modifications of KRN7000 did not alter its interaction with CD1d. In all cases, cytokine secretion was observed. Further studies are in progress to describe the *in vivo* cytokine profile. In a second step, we developed liposomal constructs incorporating KRN7000 to optimize its presentation to DCs. Some constructions containing KRN7000 were able to associate a peptide, a targeting molecule of DCs or TLR ligands. Even if the anergy phenomenon induced by repeated administrations of KRN7000 could not be regulated by the use of liposomes, we have shown that encapsulated KRN7000 is still supported by DCs and that an immune response resulting in cytokines secretion by iNKT cells is induced.

Keywords : α -galactosyl-ceramide – dendritic cells – iNKT cells – drug delivery systems – DCs targeting - liposomes