



HAL
open science

Développement d'une plateforme de criblage pour la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses : applications à *Pseudomonas aeruginosa*.

Alice Goudot

► To cite this version:

Alice Goudot. Développement d'une plateforme de criblage pour la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses : applications à *Pseudomonas aeruginosa*.. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2013. Français. NNT : 2013ECDL0023 . tel-01087080v2

HAL Id: tel-01087080

<https://theses.hal.science/tel-01087080v2>

Submitted on 22 Mar 2018

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.

ECOLE CENTRALE DE LYON

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Ecole Doctorale: Electronique, Electrotechnique et Automatique
Spécialité : STIC Santé et Micro et nano technologies

Par

Alice GOUDOT

Développement d'une plateforme de criblage pour la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses : applications à *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse préparée à l'INL-Ecole Centrale de Lyon
Sous la direction d'Eliane SOUTEYRAND
Codirigée par Yann CHEVOLOT

Soutenance prévue le 24/09/2013 devant la commission d'examen composée par

M. François Morvan

M. Pierre Labbé

M. Nicolas Winssinger

Mme. Eliane Souteyrand

M. Yann Chevolot

Directeur de recherche INSERM-UM2-Montpellier

Professeur -UJF-Grenoble

Professeur - UNIGE-Genève

Directeur de recherche CNRS-ECL-Lyon

Chargé de recherche CNRS-ECL-Lyon

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur

Co-directeur

REMERCIEMENTS

A cet instant, on croit que le plus dur a été fait (manuscrit rédigé, thèse soutenue) et pourtant... ces pages me semblent désormais être les plus difficiles à écrire !! Elles sont néanmoins les plus attendues et espérées. En effet, je me souviens de Pauline et Emeline qui m'ont demandées mon manuscrit à l'issue de ma « Defense »...Je me souviens avoir été surprise par leur demande :

« Quel intérêt à désirer regarder ce pavé, semblant indigeste comparé au pot de thèse spécial Bourguignon préparé et en attente d'être dégusté ??? Ce n'est probablement pas l'envie de le conserver en tant que livre de chevet pour trouver le sommeil quand même ??^^... Seule Lucie pouvait avoir une envie comme celle-là pour s'occuper le soir à son colloque à Porquerolles !! ».

Puis en voyant rapidement leurs 2 petites têtes déconfites j'ai compris qu'il s'agissait bien évidemment de leur envie de lire mes remerciements qui, malheureusement pour elles, n'avaient pas encore vus le jour^^. J'ai donc maintenant le stress et la tâche difficile de trouver un mot pour chacun(e), en étant certaine que je n'oublierai personne. Je tiens donc à rester concentrée pour me remémorer tous les souvenirs que j'ai accumulés pendant ces 3 ans, bien que mon esprit soit déjà bien occupé aux derniers préparatifs pour mon départ pour 3 semaines sur la côte-ouest des États-Unis !!

Je souhaite tout d'abord remercier M. Frank DEBOUCK, directeur de l'Ecole Centrale de Lyon et les directeurs de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon, Dr. Guy HOLLINGER_ désormais à la retraite_ succédé par Dr Catherine BRU-CHEVALLIER et son directeur adjoint Dr. Christian SEASSAL et enfin Dr. Gérard SCORLETTI, directeur de l'école doctorale EEA, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'école Centrale de Lyon, dans l'institut des nanotechnologies de Lyon et via l'école doctorale EEA.

Je suis heureuse de remercier chaleureusement tous les membres de mon jury de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et qui a donné lieu à des discussions très enrichissantes et je l'espère, de futures collaborations avec le consortium INL-IBMM-ICBMS-UGSF. Je remercie tout d'abord Dr. François MORVAN de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Merci également aux Dr. Nicolas WINSSINGER et Dr. Pierre LABBE d'avoir aimablement accepté cette lourde tâche qu'a été de rapporter mon manuscrit et de m'avoir fait profiter de leur expertise pour perfectionner ce mémoire.

Puis je tiens à exprimer tous mes remerciements et ma gratitude à mes directeurs de thèse Dr. Eliane SOUTEYRAND et Dr. Yann CHEVOLOT. Vous m'avez offerts la possibilité de réaliser mon stage de fin d'étude de 6 mois puis de poursuivre par ces 3 ans de thèse. Vous avez cru en moi, vous m'avez accordés votre pleine confiance afin de réaliser ce projet et je vous en remercie. Merci Eliane pour tes conseils, ton accueil toujours chaleureux et tes anecdotes toujours plus intéressantes les unes que les autres. Un très grand merci Yann pour ta rigueur scientifique, ta disponibilité permanente et combien réconfortante pendant les heures difficiles et surtout pour toutes nos discussions qui m'ont faites progresser autant scientifiquement qu'humainement. Grâce à toi j'ai énormément appris sur le sujet mais également découvert Jimmy de Moriarty, Space Oddity de Chris Hadfield, Take five de Dave Brubeck, Angel of Death de Swann, Miles Davis, Ray Charles et bien d'autres encore. Merci à vous pour votre soutien et vos conseils prodigués pendant ces 3 ans.

Une thèse réussie provient également du laboratoire et j'ai eu la chance d'intégrer l'équipe Chimie et Nanobiotechnologie de l'Institut des Nanotechnologies basée à Ecully. Avant de s'engager pour 3 ans de thèse, beaucoup conseillent de se renseigner sur l'ambiance de l'équipe plus que le sujet de thèse proposé...en effet, ce paramètre influence énormément le moral du thésard et est un paramètre clef pour aller jusqu'au bout de la thèse. Je suis heureuse de dire que j'ai eu l'extrême chance d'avoir les deux : une équipe très sympathique ainsi qu'un sujet de recherche passionnant.

Ah cette équipe du F7 3^{ème} !! Depuis mon intégration par Isabel NABETH et Yann CHEVOLOT en mars 2010 jusqu'à présent, que de bons souvenirs !! Entre les pauses café de 10h, les repas de Noël, les barbecues d'été et j'irais même jusqu'à dire nos sessions ménage d'avant les vacances à rigoler^^. Toutes ces activités qui ont été faites ensemble nous ont soudés et permis de passer de bons moments ensemble.

Ainsi, un grand merci à tous les permanents notamment à Eliane SOUTEYRAND avec le fameux punch, Yann CHEVOLOT avec tes pâtes à l'ail, Emmanuelle LAURENCEAU avec nos mojito partagés à Cancun !!, Virginie MONNIER avec ton super comté du Jura contre mon super pain de bûcheron de Vexincourt !!, Magali PHANER-GOUTORBE avec tes anecdotes intéressantes concernant tes

voyages aux quatre coins du globe, Thomas GEHIN avec ta formation sur Rocco ou DSK (au final je ne sais pas celui quel nom lui correspond le plus ??), Maryline DISERIO avec le ban bourguignon, Isabel NABETH, ma Mac Gyver du labo, avec nos discussions, tes attentions de tous les jours (herbes aromatiques, confitures, fruits et légumes du jardin, les pizzas de ton mari, ta Crassula, savon, miel, fromage.... pas assez de place pour tout lister^^), Jean-Pierre CLOAREC avec tes histoires toujours plus rigolotes les unes que les autres, Guy STREMSDOERFER avec qui j'ai toujours adoré discuter sur tous les sujets, je trouve que tu as énormément à nous apprendre et à nous faire partager via tes différentes expériences.

Je continue en remerciant sincèrement tous les non-permanents docteurs et doctorants. Tout d'abord mes collègues de bureaux : Dr. Jing ZHANG pour m'avoir formée sur le projet, Dr. Zhugen YANG et Liu SHI pour les discussions et la découverte de la culture chinoise avec les raviolis du nouvel an chinois mais aussi les différents stagiaires. Et également les collègues des bureaux voisins : Dr. Ning SUI, Dr. Marie TREVISAN, Dr. Maksym IASYKOV, Dr. Delphine SICARD (merci pour les massages et les Week-end délires), ainsi que beaucoup de courage et de réussite pour les futurs docteurs Amandine CORNILLON, Francisco PALAZON, et Lucie DUPIN que j'ai rencontrée en mai 2013 et avec qui j'ai été ravie de travailler ces quelques mois pour expliquer et former sur le projet afin de reprendre la suite de cette thèse (t'inquiète tu vas gérer la suite du projet !!). Merci à tous pour votre amitié, joie de vivre et votre soutien dans les bons comme les moins bons moments de la thèse. Il est très important de pouvoir compter sur des personnes pendant certaines passes difficiles et également de partager les moments de joie. Ainsi je ne pouvais pas oublier Dimitri CHARRIER, post doc, et Marie-Virginie SALVIA, ATER, dans le listing de ces personnes qui me sont chères et qui ont largement participées à me motiver et me remonter le moral pour atteindre l'objectif et aboutir à une réussite.

J'ai eu la chance de vivre l'expérience d'un projet multidisciplinaire très intéressant et enrichissant. Ce dernier n'aurait pu voir le jour ni tenir dans la durée via de nouvelles bourses sans les précieuses collaborations des différents laboratoires partenaires. J'adresse donc mes remerciements à chacun pour leur collaboration : l'ICBMS à Lyon avec Dr. Sébastien VIDAL, l'UGSF à Lille avec Dr. Olivier VIDAL et Dr. Catherine ROBBE et Dr. Gérard VERGOTEN ainsi que l'IBMM à Montpellier avec Dr. François MORVAN, Dr. Jean-Jacques VASSEUR et Albert MEYER. Je vous remercie chaleureusement pour toutes les discussions et brainstormings passionnés pendant les réunions ANR trimestrielles qui se valaient sérieuses mais toujours sous la bonne humeur. Je garderai un souvenir de notre périple à Lille devant l'hôtel « Le Carlton » (photo à l'appui^^). Merci également aux doctorantes de Montpellier rencontrées lors de ces réunions et avec qui j'ai lié amitié : Dr. Gwladys POURCEAU, Dr. Béatrice GERLAND, Caroline LIGEOUR et Francesca CASONI.

Durant cette thèse pluridisciplinaire j'ai eu le plaisir d'apprendre énormément de nouvelles choses dans des domaines qui m'étaient jusqu'à présent connus qu'en surface voire même inconnus. Je remercie infiniment pour toute l'aide apportée et le temps passé : Geneviève, Djawhar, Claude et JB concernant l'XPS, José concernant la DDX, Yves, Aziz et Brice concernant l'ellipsométrie. Un grand merci aussi à Radeck, Pierre et Jean-Louis concernant la plateforme NanoLyon.

Je souhaiterais exprimer mes remerciements au personnel administratif : Martine, Nicole, Thérèse, Sylvie, Emmanuelle et particulièrement Patricia (même si tu as failli m'envoyer en conférence en Afghanistan au lieu de Cancun !) Maryam et Corine (même si je n'ai pas réussi à te convaincre d'investir dans un vélo électrique !) pour les rigolades pendant les déjeuners.

Je ne pouvais pas ne pas glisser un mot sur ECLAT !!! Grâce au sex-prez Romain on s'est lancé dans l'aventure ECLAT avec Delphine, Sam et mon pti FloFlo puis l'année suivante, en reprenant la présidence, avec mes acolytes : trésor Jérémy et sex-secréR Patricio, nous voilà repartis de plus belle, avec de nouveaux projets à faire et en relançant la machine ECLAT au sein de tous les laboratoires ainsi qu'une grande visibilité auprès de l'administration de Centrale via l'organisation de la JDD (Journée des doctorants, proposée par le directeur de Centrale M. Frank DEBOUCK et pour la première fois lancée en 2012), des sorties culturelles et scientifiques. Tous ces projets ont été des réussites (sauf l'annuaire des anciens Amandine n'est-ce pas ? :-D). Je tiens donc personnellement à remercier tous les membres d'ECLAT pour leur aide quant aux organisations : une spéciale pour Patricio et Jérémy évidemment ainsi que Laura (qui a très bien repris le flambeau), Flavien, Cyrielle, Amandine, Hervé et Paco. Sans leur aide et leur professionnalisme, ces projets n'auraient pu voir le jour !! Vous êtes devenus de vrais amis et c'est un plaisir de vous revoir et fêter nos retrouvailles comme il se doit : restaurant au lycée professionnel, jorky, petits bars puis tous chez Patricio. Quelle ambiance !! Et merci pour les croissants du matin Patricio ;-).

Je n'oublie évidemment pas les souvenirs extras pendant les sessions foot mixtes entre doctorants qui se trouvaient souvent être des 2ou 3 filles au milieu de grands joueurs de foot et gardiens^^. Mais grâce à vous on a pu progresser rapidement !! ☺. Merci à Romain, FloFlo, Patricio, Jérémy, André, Kévin, Miguel, Mika, Laura, Cyrielle, Flavien, Juliette et Fabien sans oublier les anciens Delphine, Sophie, Sam, Keny, Gaylord, Olivier et j'en oublie...

Sans oublier les mémorables rencontres enrichissantes tout au long de ces 3 ans, parmi les différents laboratoires. Je m'excuse d'avance de ne pas pouvoir citer tout le monde mais un petit mot particulier pour Felipe qui a toujours été de bons conseils, disponible et réconfortant. Mélanie, futur docteur Bibiche, avec qui on a partagé énormément de bons souvenirs en compagnie de Delphine, docteur Bichette !!

Je sors du cadre du labo en souhaitant remercier toute l'équipe de hand ainsi que THE COACH Did, COACH Lolo et COACH Bambi. J'ai été ravie de tomber sur Caluire handball en 2010, quoique le club de Villeurbanne paraissait sympa aussi^^ ;-). Que de bons moments passés à s'entraîner avec vous les filles mais surtout à rigoler !! J'ai eu des moments difficiles, des soirs où je ne pouvais pas aller à l'entraînement mais vous ne m'en avez jamais tenu rigueur donc merci. Un merci particulier à Did pour avoir organisé les fameux BBQ-pétanque et ainsi permettre de toujours garder une bonne ambiance. Je reviendrai à la prochaine !!

Toujours hors du cadre du labo, je ne pourrais oublier de remercier tous mes amis CPE Lyon. Tout d'abord mes premières colocataires Héloïse, Agathe et Virginie à la résidence sainte-famille puis ces 2 ans à 1 rue du lac dans le plus prestigieux des appartements à 3 qui s'est bien vite transformé en coloc à 5...cherchez l'erreur ;-). Que de bons souvenirs de tout ça. Et encore plus, suite à notre intégration à l'école qui nous a permis de faire de nouvelles et magnifiques rencontres : Quentin, Diego, Brice, Delphine et Nico, Pauline et Gd Tom, Doriane et Brian, Marjorie et Bastien et Emeline et Nadège sans oublier tous ceux que je n'ai pas cité mais impossible de lister toute la promo ! A quand les prochaines retrouvailles ? D'autres mariages ou pour fêter des naissances ?? ☺.

Sans oublier mes fidèles amis de Dijon qui resteront toujours dans mes pensées. Ce qui me rassure c'est qu'à chaque fois que nous nous retrouvons, c'est pour moi comme si nous ne nous étions jamais quitté. Nous sommes heureux de nous retrouver et avons toujours pleins de choses à nous raconter. Merci à Clémence et Julien d'avoir été présent le jour J. Et malgré votre impossibilité de venir jusqu'à Lyon, Ethel, Mélanie et Marc, je sais que vous étiez avec moi par la pensée.

Enfin, je ne pouvais pas oublier de dire un grand grand merci à toute ma famille (oncles, tantes, cousins-cousines, grands-parents, parrain Bernard et cousin Guims qui êtes venus m'encourager pour mon premier « one woman show ») et particulièrement à ma famille proche qui me suit et me soutient depuis le début et sur qui je peux et pourrai toujours compter. Papa, maman, je ne sais même pas trouver les mots pour vous remercier comme il se doit. Heureusement que vous êtes là aussi frères et sœurs Stéphanie, Baptiste et Polo !! Je souhaite vous remercier plus que mille fois pour tout. Vous avez été présents tout au long de ces 3 années intenses parcourus de hauts, de bas. Grâce à vous, votre bonne humeur, votre enthousiasme, votre écoute, votre aide... j'ai réussi à tenir le coup et à aller jusqu'au bout!!!

Je ne pourrai pas non plus oublier de te remercier sincèrement, toi qui me supporte depuis 5ans ½ maintenant et qui est resté avec moi durant ces 3 ans de thèses. Mon petit Benji, même si tu as dû t'éloigner géographiquement pour des raisons professionnelles, tu m'as toujours encouragé, tu as cru en moi, en nous, et nous voilà près à nous retrouver et à profiter pendant ces 3 semaines au pays des burgers, pancakes et cheesecakes pour fêter ensemble ce voyage de noce ... de fin de thèse.

A toutes les personnes que j'ai citées ci-dessus, celles que j'ai malencontreusement oublié de citer... et tous les lecteurs de ces quelques lignes, je vous souhaite bonheur et réussite dans votre vie professionnelle et personnelle.

Bonne continuation à tous !!

SOMMAIRE

0.	INTRODUCTION GENERALE	0-- 11 -
	Nomenclature*	0-- 14 -
	Glossaire*	0-- 15 -
1.	Chapitre 1	1-- 17 -
1.1.	Mucoviscidose et infections bactériennes	1-- 17 -
1.1.1.	Mucoviscidose	1-- 17 -
1.1.1.1.	Description générale	1-- 17 -
1.1.1.2.	Symptômes	1-- 18 -
1.1.1.3.	Infections bactériennes	1-- 19 -
1.1.2.	Pseudomonas Aeruginosa (ou PA)	1-- 21 -
1.1.2.1.	Définition générale	1-- 21 -
1.1.2.2.	Résistances innées et acquises aux antibiotiques	1-- 22 -
1.1.2.3.	Biofilm	1-- 23 -
1.1.2.4.	Les facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa	1-- 25 -
1.2.	Les lectines chez Pseudomonas aeruginosa	1-- 27 -
1.2.1.	PA-IL	1-- 28 -
1.2.2.	PA-III	1-- 29 -
1.2.3.	FliD	1-- 30 -
1.3.	Interactions sucre/lectine	1-- 31 -
1.3.1.	Considérations thermodynamiques des interactions sucre/lectine	1-- 31 -
1.3.2.	Multivalence	1-- 34 -
1.3.3.	Inhibition des lectines de PA par des glycosides multivalents	1-- 35 -
1.4.	Méthodes d'analyse des interactions glycoclusters/lectines	1-- 37 -
1.4.1.	Le biocapteur	1-- 38 -
1.4.2.	Le transducteur	1-- 41 -
1.4.2.1.	Méthode de détection optique directe avec marqueur fluorescent	1-- 42 -
1.4.2.2.	Détection sans marquage par résonance de plasmons de surface (SPR)	1-- 43 -
1.4.2.3.	Détection sans marquage par Ellipsométrie	1-- 46 -
1.4.3.	Analyses d'affinités par des mesures quantitatives	1-- 46 -
1.4.3.1.	IC_{50} : Constante d'inhibition d'un complexe	1-- 47 -
1.4.3.2.	K_d : Constante de dissociation d'un complexe	1-- 47 -
1.5.	Les biopuces pour la glycobiologie : Glycoarrays	1-- 48 -
1.5.1.	Applications des glycoarrays	1-- 49 -
1.5.2.	Préparation des oligosaccharides	1-- 50 -
1.5.3.	Immobilisation sur la puce	1-- 51 -
1.5.4.	Méthodes de fabrication et d'utilisation du glycoarray choisies dans le cadre de la thèse	1-- 53 -
1.5.4.1.	Méthode d'immobilisation développée au laboratoire	1-- 54 -
1.5.4.2.	Comparaison entre DDI et immobilisation covalente (DCI)	1-- 55 -
1.5.4.3.	Reconnaissance spécifique sucre/lectine sur support et en solution	1-- 55 -
1.6.	Objectif de la thèse	1-- 57 -
2.	Chapitre 2	2-- 59 -
2.1.	Bibliothèque des glycoclusters testés	2-- 59 -
2.1.1.	Les Galactomimétiques ou galactoclusters	2-- 60 -
2.1.2.	Les Fucomimétiques ou fucoclusters	2-- 62 -
2.1.3.	Séquences ADN	2-- 63 -
2.2.	Développement de la plateforme d'ancrage par ADN	2-- 63 -
2.2.1.	Fabrication de la plateforme microstructurée	2-- 64 -
2.2.2.	Dépôt de la couche de chrome (1)	2-- 65 -
2.2.2.1.	Photolithographie (2)	2-- 65 -
2.2.2.2.	Gravure en phase liquide (3)	2-- 66 -
2.2.3.	Silanisation, déprotection et activation des lames de verre	2-- 66 -
2.2.4.	Immobilisation du simple brin d'ADN	2-- 67 -
2.2.5.	Capping des lames	2-- 68 -
2.2.6.	Immobilisation du glycoconjugué par hybridation de l'ADN (Immobilisation « sur puce »)	2-- 69 -
2.2.7.	Reconnaissance biologique des sucres par la lectine	2-- 70 -
2.2.7.1.	Marquage des lectines	2-- 70 -
2.2.7.2.	« Sur puce » : solution de reconnaissance contenant la lectine	2-- 71 -
2.2.7.3.	« En solution » : solution de reconnaissance contenant la lectine et les glycoclusters	2-- 71 -
2.2.8.	Recyclage des lames microstructurées	2-- 72 -
2.3.	Lecture de la fluorescence	2-- 72 -

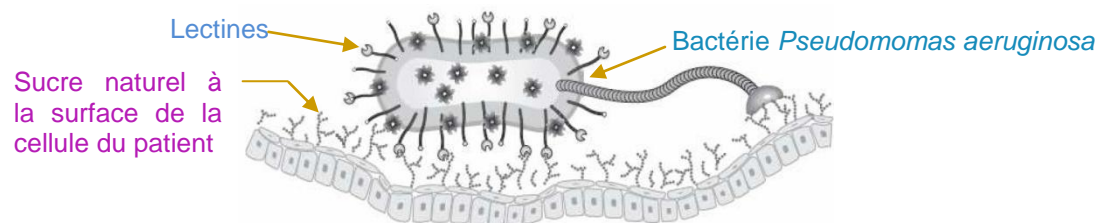
2.4.	Utilisation du glycoarray pour la mesure de fluorescence directe (FI ₆₃₅), des K _d ou des IC ₅₀	2-- 74 -
2.4.1.	Etapes communes du mode opératoire	2-- 74 -
2.4.2.	Analyse qualitative : FI ₆₃₅	2-- 75 -
2.4.3.	Analyse semi-quantitative : IC ₅₀	2-- 75 -
2.4.4.	Analyse quantitative : K _d	2-- 77 -
2.5.	Etude sur biopuce avec une surface d'or.....	2-- 79 -
2.5.1.	Matériel utilisé	2-- 79 -
2.5.1.	Prétraitements.....	2-- 80 -
2.5.1.1.	Piranha	2-- 80 -
2.5.1.2.	Plasma O ₂	2-- 80 -
2.5.1.3.	Ozone O ₃	2-- 80 -
2.5.2.	Formation des monocouches auto-assemblées (SAM).....	2-- 80 -
2.5.3.	Activation de la surface.....	2-- 81 -
2.5.4.	Caractérisation de la surface.....	2-- 81 -
2.5.4.1.	XPS.....	2-- 81 -
2.5.4.2.	DDX	2-- 82 -
2.5.4.3.	Angle de contact	2-- 83 -
2.5.4.4.	Ellipsométrie.....	2-- 83 -
3.	Chapitre 3	3-- 85 -
3.1.	Validation de l'outil « glycoarray » : Choix des séquences ADN.....	3-- 85 -
3.1.1.	Test de cross-hybridation et d'hybridation de glycocluster	3-- 87 -
3.1.1.1.	Cross-hybridation	3-- 87 -
3.1.1.2.	Hybridation de glycoclusters	3-- 89 -
3.1.2.	Séquences ADN choisies.....	3-- 92 -
3.2.	Développement de plusieurs méthodes de mesures: test qualitatif, semi-quantitatif et quantitatif.....	3-- 92 -
3.2.1.	Test qualitatif : FI ₆₃₅	3-- 92 -
3.2.1.1.	Mise en place de l'expérience du test qualitatif	3-- 94 -
3.2.1.2.	Résultats	3-- 95 -
3.2.1.3.	Discussion des résultats et conclusion	3-- 96 -
3.2.2.	Test semi-quantitatif : IC ₅₀	3-- 96 -
3.2.2.1.	Mise en place de l'expérience du test semi-quantitatif	3-- 97 -
3.2.2.2.	Résultats	3-- 97 -
3.2.2.3.	Discussion des résultats et conclusion	3-- 99 -
3.2.3.	Test quantitatif : K _d	3-- 99 -
3.2.3.1.	Mise en place de l'expérience du test quantitatif.....	3-- 100 -
3.2.3.2.	Résultats	3-- 101 -
3.2.3.3.	Discussion des résultats et conclusion	3-- 103 -
3.2.3.4.	Comparaison des K _d mesurés par glycoarray et par ITC.....	3-- 104 -
3.2.1.	Comparaison des résultats issus des 3 tests et discussion	3-- 107 -
3.3.	Conclusion	3-- 108 -
4.	Chapitre 4	4-- 111 -
4.1.	Etude d'affinité sur PA-IL	4-- 112 -
4.1.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 112 -
4.1.2.	Influence de la charge.....	4-- 113 -
4.1.2.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 114 -
4.1.2.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	4-- 114 -
4.1.3.	Influence de la topologie sur l'interaction	4-- 116 -
4.1.3.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 116 -
4.1.3.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	4-- 117 -
4.1.4.	Effet des linkers L1 et L2	4-- 121 -
4.1.4.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 121 -
4.1.4.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	4-- 123 -
4.1.5.	Influence du nombre de résidus galactose	4-- 127 -
4.1.5.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 127 -
4.1.5.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	4-- 127 -
4.1.6.	Conclusion générale sur PA-IL	4-- 130 -
4.2.	Etude d'affinité sur PA-IIL	4-- 130 -
4.2.1.	Influence de la topologie sur l'interaction	4-- 131 -
4.2.1.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 131 -
4.2.1.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	4-- 131 -
4.2.1.	Influence des linkers L1 et L2	4-- 133 -
4.2.1.1.	Glycoclusters étudiés.....	4-- 133 -
4.2.1.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	4-- 134 -
4.2.2.	Influence du nombre de résidus fucose	4-- 137 -

4.2.2.1.	Glycoclusters étudiés	4-- 137 -
4.2.2.2.	Etude sur DDI-glycoarray.....	4-- 137 -
4.2.3.	Conclusion sur l'étude d'affinité avec PA-III	4-- 140 -
4.3.	Etude d'un hétéroglycocluster dirigé contre PA-IL et PA-III	4-- 140 -
4.3.1.1.	Glycoclusters étudiés	4-- 140 -
4.3.1.2.	Etude sur DDI-glycoarray.....	4-- 141 -
4.4.	Etude d'affinité sur FliD	4-- 143 -
4.4.1.1.	Etude sur DDI-glycoarray.....	4-- 144 -
4.5.	Conclusions et Perspectives	4-- 146 -
5.	Chapitre 5	5-- 149 -
5.1.	Etude d'affinité sur une lectine de <i>Burkholderia Ambifaria</i> : BamBL.....	5-- 149 -
5.1.1.1.	Glycoclusters étudiés	5-- 150 -
5.1.1.2.	Étude sur DDI-glycoarray.....	5-- 151 -
5.2.	Etude d'affinité sur une lectine de <i>Viscum album</i> : VAA (<i>Viscum album L. agglutinin</i>).....	5-- 153 -
5.2.1.1.	Étude sur DDI-glycoarray.....	5-- 154 -
5.3.	Etude d'affinité sur des Galectines.....	5-- 155 -
5.3.1.1.	Étude sur DDI-glycoarray.....	5-- 156 -
5.4.	Etude de l'activité enzymatique et de la spécificité d'une protéine virale du virus de la grippe	5-- 157 -
5.4.1.	Virus de la grippe	5-- 157 -
5.4.2.	Etude de l'activité enzymatique de la neuraminidase.....	5-- 159 -
5.4.3.	Etude de la spécificité de la neuraminidase	5-- 164 -
6.	Chapitre 6	6-- 167 -
6.1.	Introduction.....	6-- 167 -
6.2.	Les SAM (Self Assembled Monolayers).....	6-- 168 -
6.2.1.	Qu'est-ce qu'une SAM.....	6-- 168 -
6.2.2.	SAM simple	6-- 169 -
6.2.3.	SAM mixte	6-- 170 -
6.3.	Effet du prétraitement (Piranha, Plasma O ₂ ou Ozone O ₃) sur le substrat.....	6-- 171 -
6.3.1.	Caractérisation des prétraitements par XPS.....	6-- 172 -
6.3.2.	Caractérisation des prétraitements par DDX	6-- 173 -
6.3.1.	Caractérisation des prétraitements par angle de contact	6-- 174 -
6.3.2.	Conclusion générale sur les prétraitements	6-- 175 -
6.4.	Fonctionnalisation chimique de la surface	6-- 176 -
6.4.1.	Caractérisation de la fonctionnalisation par angle de contact	6-- 177 -
6.4.2.	Caractérisation de la fonctionnalisation par DDX	6-- 178 -
6.4.3.	Caractérisation de la fonctionnalisation par ellipsométrie	6-- 180 -
6.5.	Conclusion sur la fonctionnalisation d'une surface d'or	6-- 181 -
7.	CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES	7-- 183 -
ANNEXE :	Structures développées des Glycoclusters.....	7-- 187 -
7.1.	Bibliothèque des glycoclusters testés	7-- 187 -
7.1.1.	Les Galactomimétiques ou galactoclusters.....	7-- 188 -
7.1.2.	Les Fucomimétiques ou fucoclusters.....	7-- 200 -
7.1.3.	L'hétéroglycocluster.....	7-- 206 -
7.2.	Séquences ADN	7-- 207 -
Bibliographie.....		7-- 209 -
Liste des publications et communications		7-- 219 -

INTRODUCTION GENERALE

En France, actuellement 6000 personnes souffriraient de la mucoviscidose. Cette maladie génétique grave prédispose les patients à un grand nombre de pathologies infectieuses chroniques entre-autres respiratoires et digestives. Grâce aux progrès de la recherche et des soins, pour les enfants qui naissent aujourd'hui, l'espérance de vie est de 46 ans, alors qu'elle n'était que de 7 ans en 1965. Mais l'âge moyen de décès de l'ensemble des patients n'est que de 29 ans. (<http://www.vaincrelamuco.org> 2013). Les infections chroniques suite à l'infection par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sont la principale cause de mortalité de ces patients. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à coloration Gram-négative, aérobique qui se fixe entre autres au niveau de la paroi pulmonaire. Un flagelle monotriche assure sa motilité. L'arsenal d'adhésion de la bactérie sur les parois des cellules du patient est constitué par des facteurs de virulence dont trois lectines : PA-IL, PA-IIL et FliD. Les lectines sont des protéines capables de reconnaître de manière spécifique et réversible des carbohydrates (ou sucres) présents à la surface des cellules membranaires (Ambrosi et al. 2005; Lis and Sharon 1998).

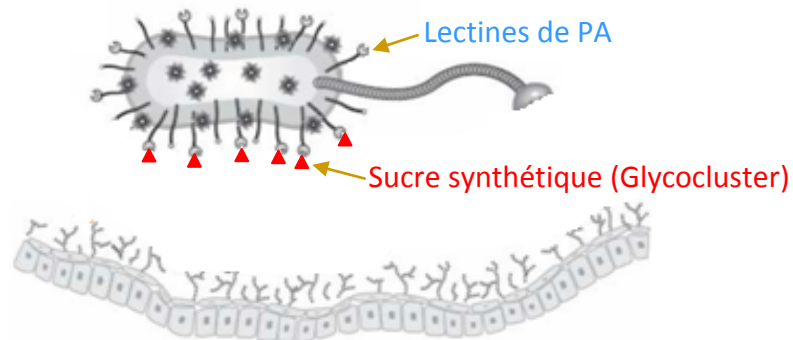
Schéma de l'adhésion de la bactérie sur la cellule du patient via l'interaction lectine/sucre (Imberty and Varrot 2008)



La bactérie tire profit des points d'ancrage (les sucres) présents à la surface des tissus pulmonaires pour les coloniser et gêner l'action des traitements antibiotiques (Stewart and Costerton 2001). Dans la perspective de trouver de nouveaux traitements, une stratégie est de rechercher des leures moléculaires à partir de sucres synthétisés chimiquement, qui possèderaient une meilleure affinité que les sucres naturels vis-à-vis des lectines. Ces derniers seraient susceptibles d'empêcher/de perturber la phase initiale d'ancrage dans l'espoir de rendre le pathogène plus vulnérable et plus sensible aux traitements. Ces molécules pourraient être à la base d'un nouveau traitement thérapeutique visant à empêcher la colonisation bactérienne du patient et donc, son infection chronique.

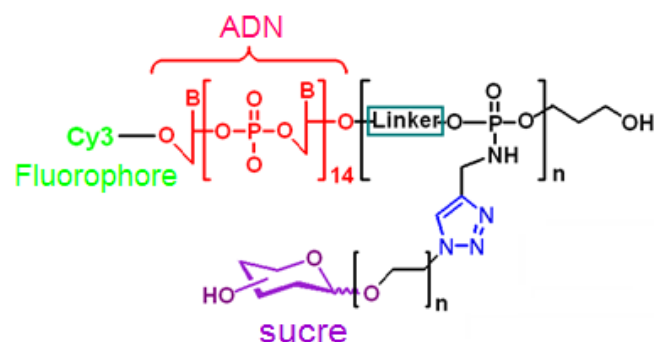
Le but de ma thèse est de trouver un leurre moléculaire (glycomimétique ou glycocluster) ayant une forte affinité avec les lectines de la bactérie.

Schéma de l'action du sucre synthétique en tant que traitement potentiel



Ceci suppose une étude fine des interactions carbohydrates-protéines (ou plus simplement : glycocluster/lectines). Cependant, un des verrous technologiques de ce type d'étude est lié à la très grande diversité des carbohydrates naturels et des faibles quantités de matériels biologiques disponibles. Pour contourner ces difficultés, nous avons combiné l'utilisation d'une plateforme miniaturisée originale de type « puce à ADN 3D » avec des glycoclusters synthétiques (sucres synthétisés chimiquement, qui miment les sucres naturels). Ce système permet de cribler simultanément un grand nombre de glycoclusters vis-à-vis des lectines. Grâce à la flexibilité de construction des glycomimétiques par chimie de synthèse, de nombreuses structures possédant des configurations spatiales et des architectures variées (linéaires, en antennes, en couronne) ont pu être synthétisées.

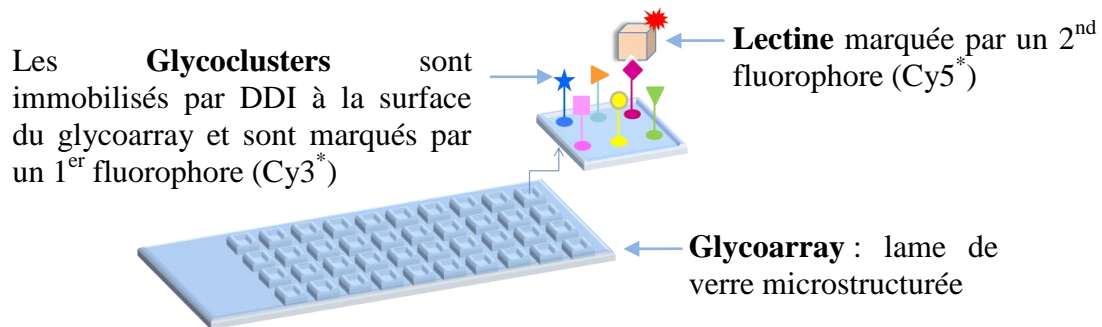
Schéma de la structure de nos glycomimétiques/glycoclusters (Chevolot et al. 2007a)



La méthode d'immobilisation choisie est la méthode d'immobilisation spécifique par hybridation de l'ADN appelée **DDI*** (DNA Directed Immobilization), développée au laboratoire. La figure suivante représente le schéma de notre biopuce (glycoarray) fonctionnalisée chimiquement afin de pouvoir immobiliser une bibliothèque de glycoclusters dirigés contre une lectine (Chevolot et al. 2007a). Cette biopuce nous permet de déterminer

quel glycocluster a le plus d'affinité avec la lectine, donc celui qui permettrait le meilleur traitement potentiel.

Schéma représentatif d'un glycoarray avec immobilisation dirigée du glycomimétique par hybridation de l'ADN (DDI).



Dans un premier temps, nous avons essentiellement comparé les affinités glycoclusters/lectines par des mesures qualitatives de fluorescence. Ceci nous a permis de sélectionner, parmi toutes les structures, deux glycoclusters montrant une très forte affinité pour la lectine PA-IL. Cependant le besoin de quantifier l'affinité nous a conduit à développer des mesures quantitatives d'IC₅₀ et de K_d sur les glycoarrays. L'IC₅₀ est la concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber l'interaction sucre-protéine à 50% et le K_d est le coefficient de dissociation du complexe sucre-protéine mais ces termes seront plus largement décrits par la suite. Ce travail relate donc le développement technologique du système de mesure et sa mise en œuvre pour la détermination des affinités sucres/lectines.

La synthèse des glycomimétiques conjugués avec l'ADN est faite par l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de Montpellier (IBMM) en collaboration avec l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire de Lyon (ICBMS). Les lectines sont fournies gracieusement par le CERMAV à Grenoble. Ces structures sont testées sur glycoarray, chez nous, à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL). Et les tests in vivo et in vitro sont réalisés par l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, groupe de génétique des enveloppes bactériennes à l'université des sciences et technologies de Lille.

Nomenclature*

A:	Adénine	NA:	Neuraminidase
AcNAr:	Acétyle-N-Phényle	NHS:	N-hydroxysuccinimide
ADN:	Acide désoxyribonucléique	ODN:	Oligonucléotide
AFM:	Microscopie à force atomique	PBS:	Phosphate Buffered Saline
Ara:	Arabinose	PBS-T₂₀:	PBS avec du Tween 20
BSA:	Bovine Serum Albumin	PCR:	« Polymerase chain reaction » (réaction de polymérisation en chaîne)
BuT:	Butyle-Thymine	Pe:	Pentaerythritol
C:	Cytosine	pI:	Point isoélectrique
Cy3:	Cyanine 3	Pmt :	Photomultiplicateur. Indice de résolution lors de la lecture de fluorescence
Cy5:	Cyanine 5	Pro:	Propyle
CRD:	Carbohydrate recognition domain	Ribo:	Ribose
DCI:	Direct Covalent Immobilisation	SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
DDX:	X-Ray Diffraction	SL:	Sialyllactose
DDI:	Direct DNA Immobilisation	SLN :	Sialyllactose N-acétylé
DMCH:	1,4-Dimethylcyclohexane	SPR :	Surface Plasmon Resonance
dT:	Thymidine	SSC :	Saline sodium citrate
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	t.a.:	Température ambiante
EG_{2/3/4}:	Di/Tri/Tétra éthylène glycol	TCI D₅₀ :	« Tissue culture infectious dose » (DICC ₅₀ en français : Dose infectieuse en culture de cellule)
FRET :	Transfert d'énergie entre des molécules fluorescentes	THF:	Tétrahydrofurane
Fuc :	Fucose	Thme:	1,1,1-(trishydroxyméthyl)éthane
Gal:	Galactose	Tween₂₀ :	Polysorbate 20. Détergent et émulsifiant. Surfactant stable et non toxique.
Glc:	Glucose	Tz :	Triazole
G:	Guanine	T:	Thymine
HA:	Hémagglutinine	ua. :	unité arbitraire
IC₅₀:	Half maximal inhibitory concentration	Xylo:	Xylose
ITC:	Isothermal Titration Calorimetry	XPS :	X-ray Photo-electron Spectroscopy
Lac:	Lactose	3'-SL :	α-2,3-sialylglycoconjugué
[Lac]:	Concentration en lactose	6'-SL :	α-2,6-sialylglycoconjugué
M:	Méthyle		
Man:	Mannose		
min:	Minute		
MM:	Masse molaire en gramme par mole		

Glossaire*

- Acide sialique :** Ou acide N-acétylneuraminique. Constituant caractéristique des sucres qui jouent un rôle important dans les interactions intercellulaires. Sa charge négative donne cet aspect visqueux à la salive et au mucus.
- Aglycone :** Groupement non-glucidique du glycocluster.
- Aminosides :** Glucides substitués par des fonctions amine (-NH₂). Ils constituent une famille d'antibiotiques actifs sur certains types de bactéries.
- Biacore :** Technologie spécialisée dans la mesure des interactions protéines-protéines. Elle est basée sur la mesure par SPR.
- BSA :** Albumine de sérum bovin. Utilisée en laboratoire comme agent bloquant. Sa grande utilisation est due à sa stabilité, à son absence d'effets dans de nombreuses réactions biochimiques et à son faible coût.
- Cible :** Molécule à détecter dans le milieu liquide.
- Centrifugation :** On peut caractériser la centrifugation par l'accélération γ en nombre de g (g désignant l'accélération au sol de la pesanteur [$g = 9,81 \text{ m/s}^2$]) ou bien par la vitesse de rotation **N** en tours par minute (rpm= « rotation per minute »). L'accélération centrifuge s'exprimant alors $\gamma = (2\pi N/60)^2 \cdot R$ avec R désignant le rayon de rotation (en mètre).
- Cœur hexose :** Ce sont des sucres (monosaccharides) qui comportent 6 atomes de carbone (ex : glucose ou galactose ou mannose).
- Cœur pentose :** Ce sont des sucres (monosaccharides) qui comportent 5 atomes de carbone (ex : ribose ou xylose ou arabinose).
- Dendrimère :** Polymère sphérique hyperbranché.
- Gram :** Test colorimétrique de mise en évidence des caractéristiques membranaires et de la paroi d'une bactérie. Bactérie gram positif (apparaît mauve au microscope) et gram négatif (apparaît rose au microscope).
- IC₅₀ :** Concentration d'une molécule qui inhibe 50% de l'action qui devrait être faite par une autre molécule
- Mucines :** Grande protéine fortement glycosylée et entrant dans la composition de nombreux mucus.

- MALDI-TOF-MS:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
- PBS :** Tampon isotonique non-toxique utilisé en biologie cellulaire. Utilisé comme solution de rinçage car il structure l'eau autour des biomolécules (protéines, glucides...) immobilisées sur des surfaces solides. (Composition : 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ qsp 1000ml d'H₂O)
- PNA :** « Peptide Nucleic Acid » ou acide nucléique peptidique. Molécule aux bases similaires à l'ADN mais qui se différencie par son squelette. Les PNA ne sont pas connus pour exister naturellement sur Terre. Ils sont synthétisés artificiellement et utilisés dans la recherche médicale et dans certaines thérapies.
- ODN :** Les oligonucléotides sont de courts segments d'acides nucléiques (ARN ou ADN), longs de quelques dizaines de nucléotides. Ils sont en général obtenus par synthèse chimique, sous forme simple brin.
- Quorum sensing :** Détection du quorum. Ensemble de mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression coordonnée de certains gènes bactériens au sein d'une même population bactérienne
- RCA₁₂₀ :** Ricinus Communis Agglutinin 120 est une lectine spécifique du galactose. Lectine, isolée de la graine de ricin, toxique et capable d'inhiber la synthèse des protéines dans les cellules eucaryotes.
- SDS :** Détergent et surfactant ionique fort utilisé en biochimie et biologie moléculaire.
- Sonde :** Molécule immobilisée à la surface de la biopuce.
- Spotter :** Robot de dépôt de gouttes (300 picolitres) de matériel biologique par une aiguille métallique activée avec un système piézoélectrique avec une précision de 5 microns et à la cadence d'environ 5000 spots à l'heure.
- SSC :** Tampon utilisé en biochimie lors du lavage des biopuces. (Composition pour une solution à 20X : 3M NaCl et 300mM trisodium citrate ajusté au pH de 7.0 avec du HCl)
- TCID₅₀ / mL :** Nombre de particules infectieuses par millilitre capables d'infecter 50% de la culture cellulaire.

Chapitre 1

Etat de l'art

Dans ce premier chapitre sera présenté le contexte de la recherche : *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie Gram-négatif* opportuniste inoffensive pour les individus en bonne santé, mais pouvant s'avérer dangereuse chez les individus immuno-déprimés. Elle est avec les entérobactéries et les staphylocoques l'un des principaux germes impliqués dans les maladies nosocomiales. Elle est aussi la principale cause de mortalité et morbidité des patients atteints de la mucoviscidose. La colonisation des voies respiratoires supérieures par ces microorganismes conduit souvent à une pneumonie chronique et éventuellement au décès du patient malgré l'utilisation massive d'antibiotiques. La formation du biofilm ainsi que l'émergence de souches résistantes semblent lui donner un avantage sélectif vis-à-vis de ces molécules. Dans la lutte contre *Pseudomonas aeruginosa*, une alternative aux antibiotiques est l'inhibition de ses facteurs de virulences notamment ceux impliqués dans l'adhésion et la formation du biofilm. Certains de ces facteurs de virulences sont impliqués dans des interactions de type sucres/protéines. Ces protéines sont appelées lectines. Notre travail a été de mettre en évidence l'existence de molécules inhibitrices de ces lectines impliquées dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*.

Avant d'aborder la définition des termes sucres/ lectines, un bref aperçu a été fait sur la mucoviscidose et sur les infections bactériennes associées. Puis les mécanismes d'interaction entre deux entités biologiques sont présentés pour enfin parler des méthodes d'analyses utilisées pour caractériser cette interaction.

1.1. Mucoviscidose et infections bactériennes

1.1.1. Mucoviscidose

1.1.1.1. *Description générale*

La fibrose kystique (FC), ou mucoviscidose, est la maladie génétique mortelle héréditaire la plus fréquente dans les populations caucasiennes. En France, en 2010, le

nombre de patients atteints de mucoviscidose est estimé à 6000. Il y a autant d'hommes que de femmes touchés. Cette maladie est toujours transmise conjointement par le père et la mère et survient chez 1 nouveau-né sur 4200. 2 millions de personnes sont porteuses du gène et peuvent le transmettre à leur enfant (<http://www.vaincrelamuco.org> 2013). Cette maladie se caractérise par une viscosité (épaississement) anormale du mucus (liquide fabriqué par des glandes) sécrété au niveau des intestins, du pancréas et des bronches.

1.1.1.2. Symptômes

Le gène impliqué dans la mucoviscidose a été identifié en 1989 par une équipe canadienne (Kerem et al. 1989). Situé sur le chromosome 7 humain, il code pour une protéine appelée régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR). Il a été répertorié plus de 1800 mutations différentes sur le gène CFTR déclenchant les symptômes de la mucoviscidose (de Becdelievre et al. 2011). Cette protéine, normalement produite dans un certain nombre de tissus dans le corps, régule le mouvement des sels (ions chlorures) et de l'eau dans et hors de ces cellules. L'anomalie du gène CFTR altère la protéine CFTR chez les personnes atteintes de fibrose kystique (FC). En conséquence l'absence ou le dysfonctionnement du canal à chlorure engendre une sécrétion de mucus épais par les différents tissus (mucus + viscosité = mucoviscidose), propice au développement de nombreuses infections pulmonaires aiguës ou chroniques d'origines diverses (bactériennes, virales ou fongiques).

La mucoviscidose est une maladie qui touche divers types de cellules tapissant certains organes (voies respiratoires, pancréas, foie...) (*Figure 1-1*). Les symptômes et complications les plus sérieux de la mucoviscidose sont liés à l'atteinte du pancréas et des voies respiratoires. Dans plus de 90% des cas, c'est la maladie pulmonaire qui se révèle fatale.

- obstruction des canaux pancréatiques (fibrose du pancréas) → les enzymes essentielles à la bonne digestion ne sont pas rejetées dans l'intestin ce qui conduit à une mauvaise assimilation des aliments.
- obstruction des voies respiratoires → les multiples impuretés que nous respirons ne sont plus expectorées. L'augmentation de la charge bactérienne favorise l'installation des infections chroniques.

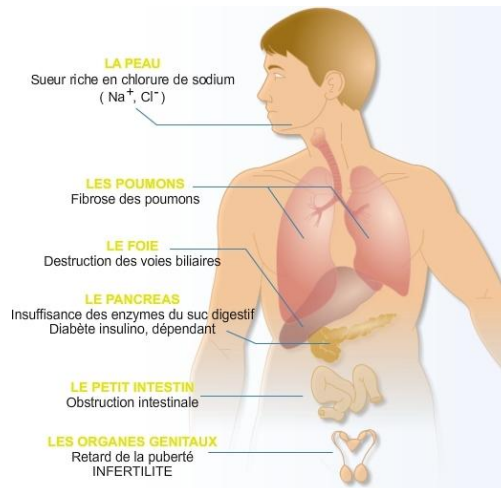


Figure 1-1 Les organes atteints par la mucoviscidose (<http://www.vaincrelamuco.org> 2013)

1.1.1.3. Infections bactériennes

La mucoviscidose engendre un environnement particulièrement favorable aux infections bactériennes (Figure 1-2). En effet, le mucus est d'ordinaire composé de deux phases : une couche supérieure, visqueuse, piégeant les particules et les micro-organismes, et une couche inférieure, plus fluide, dans laquelle battent des cils présents à la surface de l'épithélium respiratoire. Leurs mouvements synchrones créent un flux balayant la couche supérieure vers le naso-pharynx afin que celle-ci soit expectorée. Chez un patient atteint de la mucoviscidose, le battement des cils est bloqué par la trop grande viscosité du mucus. Les bactéries stagnent puis s'installent sur la paroi bronchique (Lyczak et al. 2002; Worlitzsch et al. 2002).

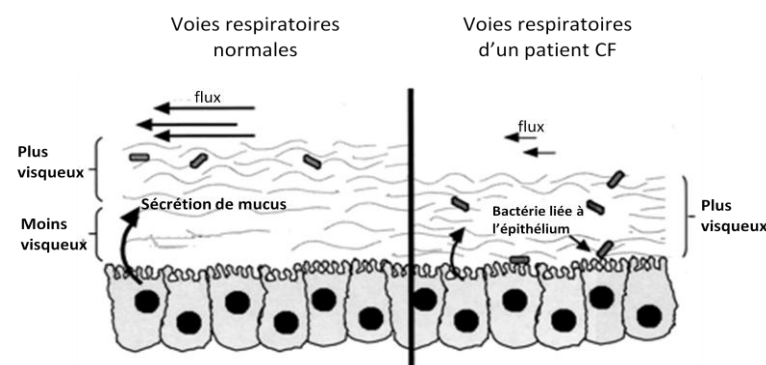


Figure 1-2 Comparaison de l'évacuation mucociliaire des voies respiratoires dans le cas normal et chez les patients atteints de la mucoviscidose (CF) d'après (Lyczak et al. 2002)

Les bilans 2006 et 2010 des données remontées par les centres participant au Registre Français de la Mucoviscidose indiquent que la colonisation bactérienne a lieu très tôt dans la vie du patient et que les espèces varient au cours de la vie (Figure 1-3).

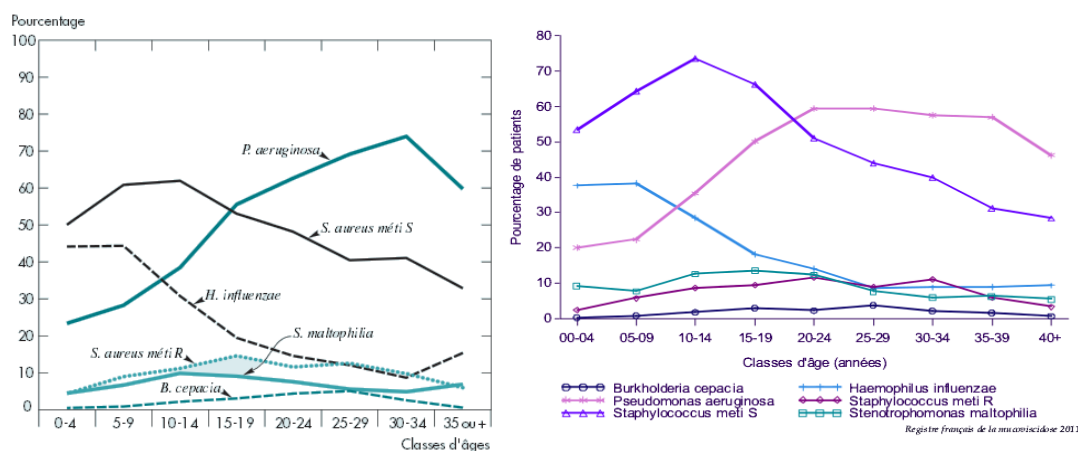


Figure 1-3 Pourcentage des patients, atteints de FC, infectés par les bactéries cliniquement importantes, selon leur âge. Comparaison des données de 2006 (gauche) et de 2011 (droite) (<http://www.vaincrelamuco.org> 2013)

Le profil de distribution de 6 germes, cliniquement importants, en fonction de l'âge du patient, reste globalement le même. Certains de ces germes atteignent des fréquences élevées dès les plus jeunes âges: entre 0 et 4 ans, *Staphylococcus aureus* est présent chez 50 à 70% des patients et *Haemophilus influenzae* est présent chez 35-45% des patients. *Pseudomonas aeruginosa*, présent chez 23,4% des patients âgés de 0 à 4 ans en 2006 contre 20% en 2011, atteint sa fréquence la plus élevée chez les 30-34 ans en 2006 (74% des patients) ou 60% chez les 20-24 ans en 2011. D'après (Lyczak et al. 2002), la détérioration préalable de l'épithélium respiratoire par *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* faciliterait l'adhésion de PA. Toutefois, ces proportions répertoriées pour 2011 sont inférieures, à tout âge, à celles observées en 2006, les différences atteignant entre 5 et 10 points de pourcentage entre 30 et 34 ans. Cette baisse encourageante du pourcentage de malades, observée en 2011 par rapport à 2006, nous informe des progrès effectués dans la lutte antibactérienne mais il reste encore à le diminuer (<http://www.vaincrelamuco.org> 2013). Le chiffre le plus évocateur est celui de l'espérance de vie. Elle était de 7 ans pour les enfants qui naissaient en 1965, elle est de 46 ans pour ceux qui naissent aujourd'hui. Les traitements actuels restent toutefois peu efficaces contre *Pseudomonas aeruginosa* car ce pathogène, après colonisation des voies aériennes, forme un biofilm résistant aux antibiotiques (Lopes et al. 2012) et les infections qu'il engendre deviennent la cause majeure de mortalité et de morbidité (Figure 1-3).

1.1.2. *Pseudomonas Aeruginosa* (ou PA)

1.1.2.1. Définition générale

Pseudomonas Aeruginosa (PA) ou *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) est une bactérie à Gram négatif* de la famille des *Pseudomonadaceae* (Figure 1-4). C'est une bactérie ubiquitaire des environnements chauds et humides (eau, sols humides, végétaux mais également sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers êtres vivants). Inoffensive pour des individus en bonne santé, elle devient dangereuse pour les personnes immunodéprimées (mucoviscidose, SIDA, grand brûlé, etc.).

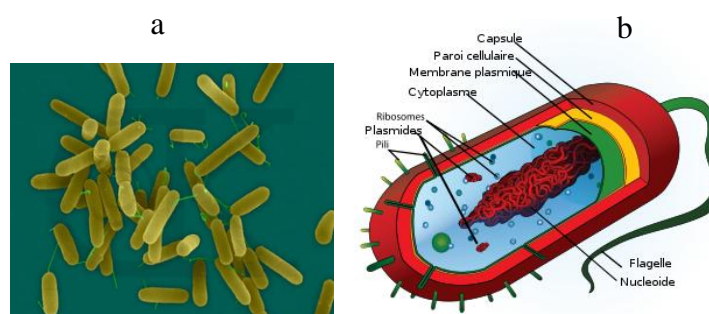


Figure 1-4 (a) *Pseudomonas aeruginosa* au MEB (<http://www.pseudomonas.com> 2013) et (b) Représentation de la structure d'une bactérie

Dans les années 1980-1990, il y a eu modification de la flore responsable des infections nosocomiales (Vaubourdolle 2001) (Tableau 1-1). La participation des bactéries à Gram positif* (staphylocoques, entérocoques) dans la colonisation de l'environnement hospitalier est devenue moindre alors que l'implication des bacilles à Gram négatif (groupe *Klebsiella/Escherichia/Salmonella* (KES), *Pseudomonas*) est devenue prépondérante.

En principe, les bacilles à Gram négatif sont tous potentiellement susceptibles de coloniser ou d'infecter des lésions cutanéomuqueuses ainsi que la plupart des dispositifs médicaux (Cholley et al. 2008). *Pseudomonas Aeruginosa* est l'exemple type du pathogène opportuniste (infections nosocomiales et infections communautaires). Elle infecte une lésion préexistante (uropathies chroniques, bronchopathies, mucoviscidose, sujets sous ventilation) pour peu que le sujet soit immunodéprimé.

Gram positif	30.4%
Staphylococcus aureus	14%
Staphylocoques coagulase négatif	8.2%
Entérocoques	6.2%

Gram négatif	62%
Escherichia coli	24.9%
Pseudomonas aeruginosa	11.9%
Acinetobacter	4.2%
Levures	6.3%
Candida albicans	4.3%

Tableau 1-1 Principaux germes responsables des infections nosocomiales en France (Carlet 1994)

Malgré l'utilisation massive d'antibiotiques, les infections par PA aboutissent souvent au développement d'une infection chronique. La résistance de PA aux antibiothérapies résulte de l'émergence de résistances innées ou acquises mais est aussi liée à la formation d'un biofilm.

1.1.2.2. Résistances innées et acquises aux antibiotiques

On parle de résistance innée (naturelle) si toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Par exemple, l'imperméabilité des parois bactériennes aux antibiotiques. On parle de résistance acquise (adaptative) lorsque quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles, deviennent résistantes. Par exemple, une mutation génétique spontanée qui apporte un avantage sélectif à la bactérie (Figure 1-5).

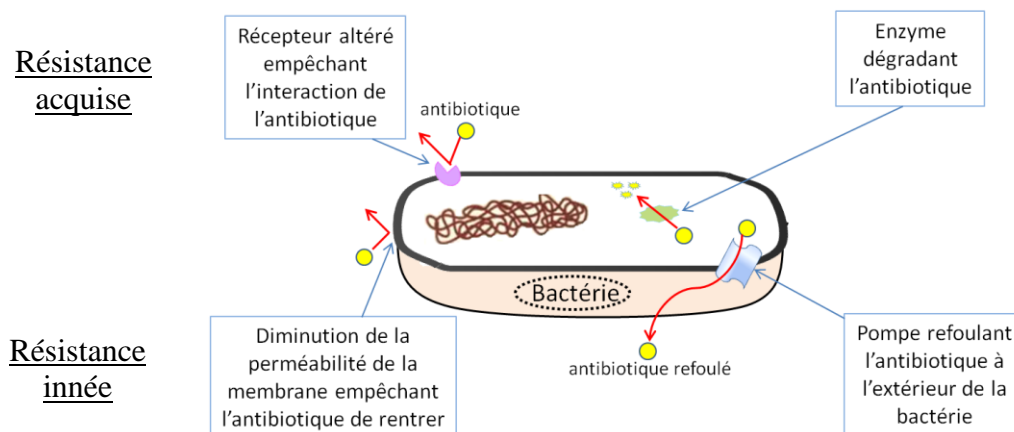


Figure 1-5 Mécanismes de résistance innée et acquise à l'antibiotique d'après (Livermore 2002; Murray et al. 2009)

Pseudomonas aeruginosa possède des résistances innées et acquises aux antibiotiques. La structure bi-membranaire de la paroi de PA, peu perméable, empêche naturellement l'antibiotique d'agir et sa pompe à efflux refoule vers l'extérieur l'antibiotique qui devrait pénétrer dans la bactérie. Ceux-ci constituent la résistance innée. Ainsi, la

prescription de plusieurs antibiotiques antityocyaniques (Pénicillines, Cotrimoxazole, Quinolones, etc.) a été nécessaire afin de détruire ou bloquer ces mécanismes d'action qui permettent la croissance de la bactérie. Mais au cours des dernières décennies, l'antibiothérapie répétitive contre PA a été l'origine d'une augmentation des taux de mortalité chez les personnes infectées à cause de l'émergence de résistances acquises (Mah and O'Toole 2001). On suppose que le cas le plus fréquent est une adaptation, qui naît de mutations génétiques aléatoires, ou qui fait suite à des échanges de gènes de résistances entre des bactéries (Livermore 2002). Par conséquent, soit la cible de l'antibiotique a été altérée (mutations altérant le récepteur de l'antibiotique), soit une nouvelle activité enzymatique qui inactive l'antibiotique est apparue (acquisition de gènes pour l'expression de β -lactamases spécifiques modifiant et détruisant les aminosides*).

Outre ces deux modes de résistances la capacité de PA à se développer en biofilm semble aussi lui conférer un avantage supplémentaire vis-à-vis des antibiotiques.

1.1.2.3. Biofilm

Le biofilm est une communauté structurée de bactéries, engluées dans une matrice polymérique extracellulaire (EPS pour extracellular polymeric substance matrix), qu'elles ont elles-mêmes produites, et qui adhèrent à une surface/interface (Costerton 1999). Les matières organiques et non organiques ainsi que les macromolécules du milieu environnant sont piégées dans ce biofilm.

La formation du biofilm se fait en plusieurs étapes (*Figure 1-6*). La première consiste en l'adhésion de la bactérie sur la surface des tissus notamment grâce aux pilis (utiles à la motilité de PA) et via le flagelle (liaison entre la lectine FliD et les mucines* (Arora et al. 1998)) et via les lectines grâce à la colonisation des surfaces (Costerton 1999; Diggle et al. 2006)). La deuxième étape est la formation de microcolonies par prolifération de cellules bactériennes puis l'édification d'une structure tridimensionnelle. La structuration du biofilm, où les bactéries sont immobiles, emprisonnées dans la matrice polymérique extracellulaire (EPS), constitue la troisième étape. Les propriétés du biofilm permettent à PA de persister à l'intérieur de l'hôte en échappant au système immunitaire et au nettoyage pulmonaire (*Figure 1-2*) et ainsi d'acquérir une résistance aux antibiotiques (Costerton 1999; Hoiby et al. 2010). Enfin il y a libération de cellules libres mobiles, pouvant coloniser à nouveau un autre tissu.

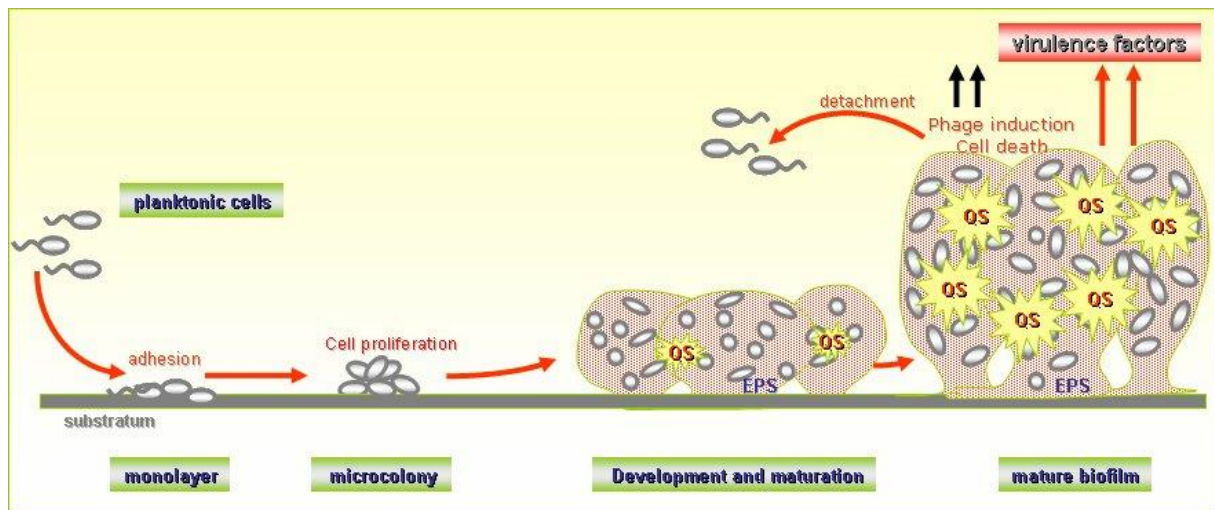


Figure 1-6 Formation du biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*. QS (quorum sensing) indique la communication inter-cellules et EPS désigne la matrice polymérique extracellulaire hydratée (Hoiby et al. 2010; Monds and O'Toole 2009)

Pseudomonas aeruginosa utilise le quorum sensing* (QS) pour détecter et coordonner la formation du biofilm, la motilité de la bactérie et l'agrégation cellulaire (Sauer et al. 2002). C'est un système de communication entre les bactéries qui consiste en la diffusion de petites molécules comme la 4-quinolone à travers les membranes bactériennes afin de modifier leur comportement en fonction de la densité bactérienne. Finalement, on peut comparer le biofilm à un château fort (Briandet et al. 2012) : colonie bactérienne organisée à l'intérieur du biofilm (canaux à eau, échanges entre cellules, etc.) procurant aussi une défense vis-à-vis des agresseurs extérieurs (Lopes et al. 2012; Stewart and Costerton 2001).

La formation du biofilm permet d'accroître d'un facteur 10 à 1000 la résistance d'une bactérie aux antibiotiques comparés à la même souche planctonique. Cet accroissement se fait au travers de différents mécanismes tels que la formation d'une barrière de diffusion, l'induction de phénotype résistant, le quorum sensing, l'hétérogénéité écologiques, etc. (Mah, 2001). Bien que les antibiotiques puissent diminuer voir supprimer les symptômes liés à l'infection, ceux-ci échouent souvent à éradiquer la population bactérienne du biofilm. Ainsi lors de l'arrêt de l'antibiothérapie, le biofilm se comporte alors comme un réservoir entraînant des infections chroniques (Stewart and Costerton 2001). Une alternative ou un complément au traitement antibiotique serait de bloquer, de déstabiliser (Kolodkin et al 2012) ou de perturber la formation du biofilm (Johansson et al. 2008; Johansson et al. 2011). De nombreuses molécules interviennent lors de la formation du biofilm notamment des facteurs de virulences. La capacité à venir perturber l'action de ces molécules offre la perspective d'interférer avec la formation du biofilm.

1.1.2.4. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

Les facteurs de virulence sont des substances produites par un micro-organisme qui lui permettent de survivre et de se multiplier dans différents microenvironnements (hôtes) et d'augmenter sa capacité à causer des maladies (Schaechter et al. 1999). Tout au long du processus infectieux, ces facteurs permettent ainsi à PA de coloniser son hôte (sécrétion de toxines, protéases) et sont impliqués dans la formation du biofilm. Par exemple, certains facteurs de virulence sont associés à la membrane bactérienne et sont impliqués dans la première et la deuxième étape de la formation du biofilm (*Figure 1-6*) en participant à la motilité (via le flagelle et les pili) et à l'adhésion (via le flagelle) de PA. Parmi l'arsenal des facteurs de virulence disponibles pour PA, certains d'entre eux sont des lectines comme par exemple PA-IL, PA-IIL, FliC, FliD, PilA, PilY1 et CupB6.

Les lectines

Les lectines (du latin *lectus*, participe passé de *legere*, signifiant « sélectionner » ou « choisir ») ont été découvertes pour la première fois en 1888 par Stillmark qui a constaté la capacité de certains végétaux à agglutiner des hématies (globules rouges) du sang des animaux (Varki et al. 2009). Le terme lectine apparaît en 1954, et définit des protéines capables de reconnaître les glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ce ne sont ni des enzymes, ni des immunoglobulines. Elles interviennent dans divers processus biologiques, au niveau de la reconnaissance entre les cellules (ex: immunité, infection) (Ambrosi et al. 2005; Sharon and Lis 2004) (*Tableau 1-2*). On les trouve dans les végétaux, les cellules animales, les bactéries et les virus. Chez les plantes elles sont appelées agglutinines car la ricine de grain de blé provoquait l'agglutination létale des hématies. Elles se localisent essentiellement dans les graines et sont, la plupart du temps, toxiques pour les animaux. Dans les cellules animales elles peuvent avoir plusieurs fonctions listées ci-dessous.

Type de lectine	Nom	Origine	Spécificité	Activité
Lectines végétales				
	Concanavalin A (ConA)	Légumes	Man/Glc	Réaction avec de nombreuses bactéries
	Ricine (RCA ₁₂₀)	plusieurs plantes (R-type)	Gal-GlcNAc	Entrée dans la cellule. Elle stoppe la synthèse protéique (toxique)
	<i>Viscum album agglutinin</i> (VAA)	plusieurs plantes (R-type)		Induit l'apoptose et la dégradation de cellules leucémiques
Lectines virales				
	Hémagglutinine (HA*)	Influenza	NeuAc	Adhésion sur cellule hôte et fusion des membranes

Lectines bactériennes

PA-IL ou LecA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (soluble, C-type)	Gal	Adhésion, Formation du biofilm, Cytotoxicité
PA-IIL ou LecB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (soluble, C-type)	Fuc	Adhésion, Formation du biofilm, Cytotoxicité
Flagellin (FliD)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (flagellaire)	Mucine	Adhésion

Lectines animales

EW29 (<i>Lumbricus terrestris</i>)	R-type	Gal	Rôle dans la migration des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques
Selectine	C-type	sLe ^x	Rôle dans le système immunitaire
Immunoglobuline	I-type	NeuAc	Rôle dans le développement embryonnaire, la réponse immunitaire ou l'apoptose
Galectine	S-types	β-galactosides	

Tableau 1-2 Exemples de lectines de microorganismes, d'origine végétale ou animale avec leur fonction (Ambrosi et al. 2005; Sharon and Lis 2004; Varki 2007)

Les microorganismes pathogènes (virus, bactéries représentés *Figure 1-7*) produisent des lectines qui leur permettent de reconnaître les sucres présents à la surface des cellules hôtes (Lis and Sharon 1998). Par exemple, les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires sont les récepteurs des lectines produites par le virus de la grippe (lectines appelées hémagglutinines) ou produites par *P. aeruginosa* (PA-IL, PA-IIL ou FliD) (Imberty et al. 2005; Imberty and Varrot 2008).

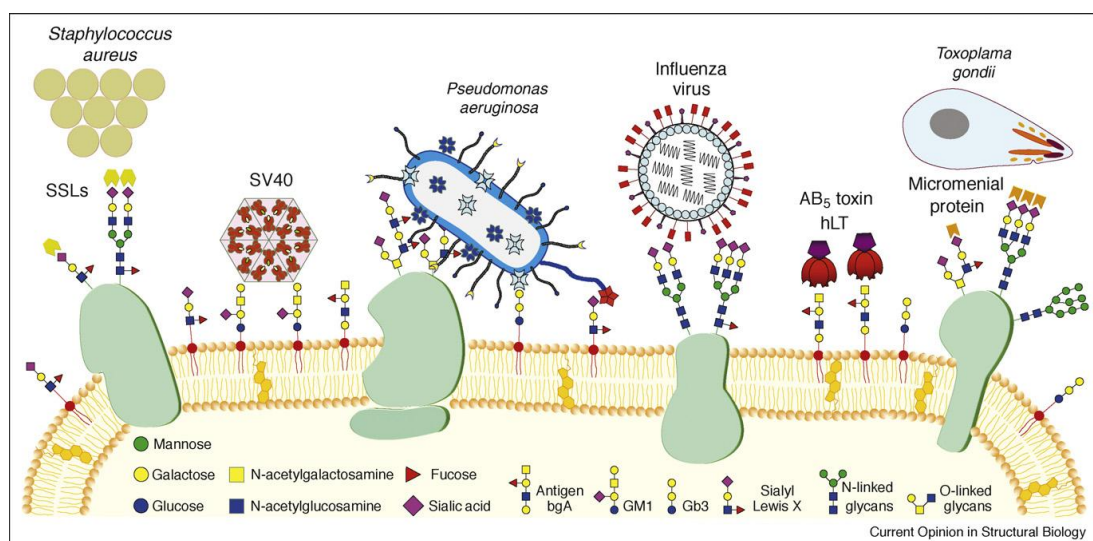


Figure 1-7 Schéma regroupant les différentes lectines retrouvées dans les microorganismes (Imberty and Varrot 2008)

1.2. Les lectines chez *Pseudomonas aeruginosa*

Comme expliqué partie 1.1.2.4, les lectines peuvent reconnaître de manière spécifique les glycoconjugués présents sur les surfaces cellulaires. Cette reconnaissance se fait de manière spécifique via les ligands sucre. Ainsi par exemple, la lectine PA-IL cible le ligand sucre galactose (Gal). Le *Tableau 1-3* ci-dessous dresse une liste non exhaustive des lectines avec leur(s) ligand(s) spécifique(s).

Lectine cible	Ligand sucre spécifique
PA-IL	Gal
PA-III	L-Fuc
PA-IL	GalNAc
PiliA, PiiY1	GalNAc(β 1, 4)Gal
PA-III	Fuc(β 1, 4)GlcNAc
PA-III	Lewis α
CupB6	Lewis β
FliC, FliD, PA-III	Lewis x
FliD, PA-III	Acide sialique de Lewis x

Tableau 1-3 Exemple de lectines et leur ligand spécifique

Nous allons principalement nous intéresser à trois lectines de *Pseudomonas Aeruginosa* : PA-IL, PA-III et FliD (*Figure 1-8*) car elles sont impliquées dans la virulence de PA. Leurs propriétés sont rassemblées dans le *Tableau 1-4*.

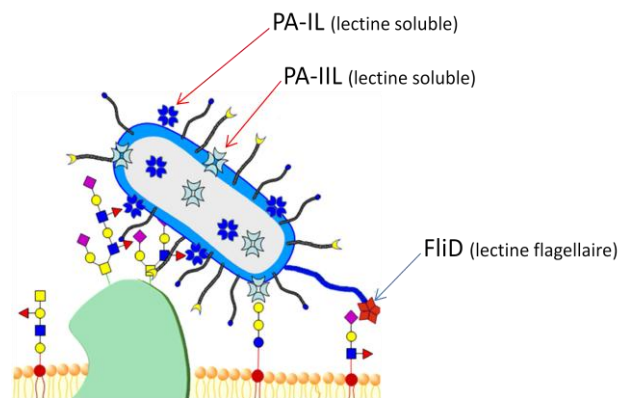


Figure 1-8 Représentation des interactions sucres/lectines de Pseudomonas aeruginosa (Imberty and Varrot 2008)

FliD est une lectine flagellaire impliquée dans les étapes précoces de la formation du biofilm tandis que PA-IL et PA-III interviennent plus tardivement, une fois le biofilm formé. PA-IL et PA-III sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie d'où leur appellation de lectines solubles. Elles nécessitent la présence d'un ou deux atomes de calcium respectivement dans le site de fixation (*Tableau 1-4*). L'ion calcium joue plusieurs rôles notamment celui de stabiliser le site de reconnaissance de la lectine (Gabijs et al. 2011).

Winzer *et al.* ont montré que ces lectines sont régulées par le *quorum sensing* une fois le biofilm formé.

Propriété	PA-IL	PA-III	FliD
Gène	<i>lecA</i>	<i>lecB</i>	<i>fliD</i>
Nombre de sous-unité	4	4	/
Nombre d'acides aminés par subunité	121	114	473
Masse moléculaire (kDa)	51	47	49,4
Monosaccharide dans le site de fixation	D-galactose	L-fucose	D-galactose
pI	4.94	3.88	7.08
Etat oligomérique	Tétramérique	Tétramérique	/
Cation dans la structure cristalline	1 Ca ²⁺	2 Ca ²⁺	/
Inhibiteurs (puissance)	D-galactose (1) Lactose (0.5) Phényl-β-Gal (57)	L- fucose (1) D-mannose (0.4) Lacto-N-fucose (5)	mucine Lewis x et dérivés : Sialyl-Le ^x ou sulfoS-Le ^x
K _d (μM)	29 (par dialyse à l'équilibre sur le D-Gal)	2,9 (par microcalorimétrie sur le L-Fuc)	/

Tableau 1-4 Propriétés biologiques des lectines PA-IL, PA-III et FliD (Arora *et al.* 1998; Imberty *et al.* 2004; Winsor *et al.* 2011)

1.2.1. PA-IL

La lectine PA-IL ou *lecA* est tétravalente. Elle reconnaît avec une affinité croissante les monosaccharides suivants : Galβ1-4Glc < D-Galactose < Galβ-O-Me < Galα-O-Me < Phényl-β-Gal. PA-IL est spécifique du D-Galactose avec une constante de dissociation (K_d) de 29μM déterminée par dialyse à l'équilibre (Cioci *et al.* 2003). La résolution de la structure tridimensionnelle (rayon X) de la lectine en présence de D-Galactose a permis de déterminer qu'un seul ion Ca²⁺ est nécessaire pour constituer une interaction efficace (Cioci *et al.* 2003; Imberty *et al.* 2004). Son activité dépend donc de la présence d'un ion calcium Ca²⁺ sur chaque monomère qui est complexé dans le site de liaison (*Figure 1-9*).

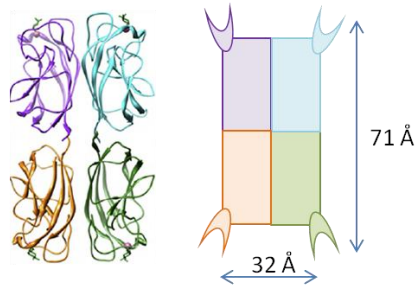


Figure 1-9 Structure cristalline du complexe PA-IL /D-Gal (1.6Å de résolution) (database 2013) et représentation schématique des sites de liaison

PA-IL présente une structure particulière de forme rectangulaire où les quatre sites de liaison au galactose, distants de 29 Å en largeur et 78 Å en longueur, sont disposés sur les quatre sommets d'un rectangle. Le point isoélectrique de la protéine a été déterminé à 4,94 (Gilboa-Garber et al. 2000). Elle est à 95% intracellulaire et 5% membranaire. A l'état pur, il a été observé que, comme les lectines végétales, la lectine PA-IL avait tendance à s'agréger (Gilboa-Garber 1982). D'autre part, l'interaction entre la protéine et le sucre serait une balance entre les interactions hydrogènes et hydrophobes (Gilboa-Garber et al. 2000).

1.2.2. PA-III

La lectine PA-III ou *lecB* est tétravalente. Elle reconnaît avec une affinité croissante les monosaccharides suivants : D-mannose < D-fructose < D-arabinose < L-galactose < L-fucose. PA-III est spécifique du L-Fucose avec une constante de dissociation (K_d) de 2,9µM déterminée par microcalorimétrie (Sabin et al. 2006). La résolution de la structure tridimensionnelle (rayon X) de la lectine en présence de L-Fucose a permis de déterminer que deux ions Ca^{2+} sont nécessaires pour constituer une interaction efficace (Mitchell et al. 2002).

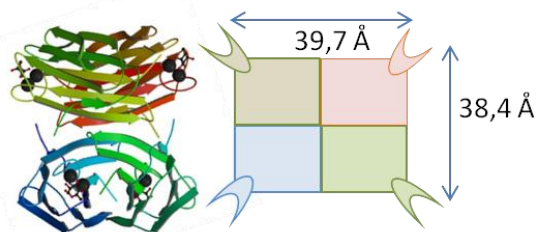


Figure 1-10 Structure cristalline du complexe PA-III/L-Fuc (1.6Å de résolution) (database 2013) et représentation schématique des sites de liaison

PA-III présente une structure particulière de forme sphérique, plus compacte que PA-IL et où les quatre sites de liaison au fucose sont disposés de part et d'autre de la sphère à une distance d'environ 40Å les uns des autres (Figure 1-10). Contrairement à PA-IL, l'interaction lectine/sucre serait principalement due à des liaisons de coordination entre le résidu fucose et la paire d'ions calcium. Les groupements hydroxyle du fucose participent à la

coordination de ces ions calcium et une interaction hydrophobe unique entre le groupement méthyle du fucose et un acide aminé Thréonine de la poche de fixation de la lectine (Sabin 2006). Une molécule d'eau assure une liaison hydrogène supplémentaire pour stabiliser le complexe formé (Imberty et al. 2004). Comme PA-IL, PA-III est à 95% intracellulaire et 5% membranaire.

1.2.3. FliD

Pseudomonas aeruginosa possède un unique flagelle responsable de la motilité de la bactérie. Le flagelle (Figure 1-11) est constitué de 3 parties : un corps de base, un crochet et un filament (Terashima et al. 2008). Le filament est constitué de protéines : les flagellines. Elles comprennent une région hypervariable, contribuant à leurs propriétés d'adhésion aux mucines bien distinctes (Duan et al. 2013).

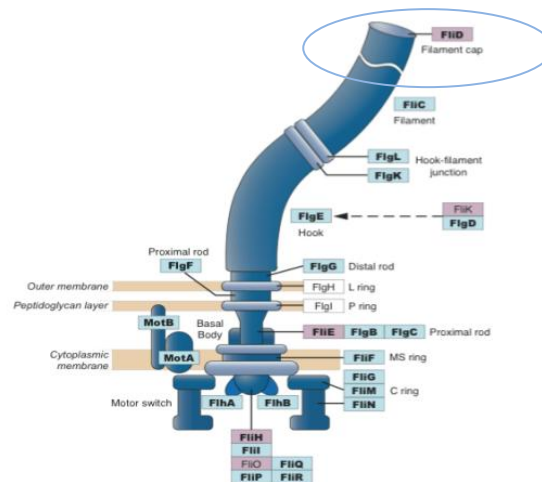


Figure 1-11 Représentation du flagelle et des différentes protéines le composant (FliD) (http://www.cbs.dtu.dk/courses/mvnworkshop08/Ex_ProbeDesign/flagella.png 2013)

FliD est une lectine flagellaire membranaire de *PA*. La structure tridimensionnelle de cette lectine n'est pas encore répertoriée dans la base de données des protéines (PDB Database). Toutefois une analyse LC-MS/MS permet de supposer que sa masse molaire est de 49,4 kDa, son point isoélectrique de 7,08 et sa charge de 0.01 à pH 7,0 (Winsor et al. 2011). Il a été démontré que la protéine flagellaire FliD participerait à l'adhésion de la bactérie aux mucines*. Les mucines sont des protéines fortement glycosylées, constituant principal du mucus avec les sels inorganiques. Cette adhésion joue un rôle important dans la colonisation initiale de *PA* dans les voies respiratoires des patients (Arora et al. 1998; Caldara et al. 2012).

Les mécanismes par lesquels *PA-IL*, *PA-III* et FliD agissent ne sont pas entièrement compris. Toutefois, de nombreuses études établissent que ces lectines sont considérées

comme des facteurs de virulence et participent à différents processus d'adhésion, de formation et de stabilisation du biofilm (Briandet et al. 2012; Chemani et al. 2009; Diggle et al. 2006). Notre objectif ultime est d'inhiber l'action de ces lectines au sein de l'organisme malade. Pour se faire, nous allons chercher des molécules, ayant une plus forte affinité avec PA-IL, PA-IIL et FliD que les sucres naturels. En effet, trouver un leurre moléculaire pour chaque lectine permettrait de bloquer leurs sites de fixation avant leur fixation sur les sucres naturels des patients. Cette méthode semble être une stratégie thérapeutique prometteuse pour empêcher l'infection de l'organisme par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3. Interactions sucre/lectine

Le but de cette thèse est donc d'identifier des molécules inhibant les interactions de PA-IL, PA-IIL et FliD avec leurs ligands naturels et de mesurer quantitativement l'affinité de ces inhibiteurs pour la lectine ciblée. Il est donc important de comprendre les facteurs régissant les interactions sucre/lectine.

Les interactions sucre/lectine sont basées sur le concept clé/serrure d'Emil Fisher (1890) entre une lectine végétale, virale, bactérienne ou animale et un sucre qui lui est spécifique. La force de cette interaction (l'affinité) est décrite par la constante d'association (K_a) ou la constante de dissociation (K_d). L'efficacité d'un composé à inhiber une fonction biologique ou biochimique peut être quantifiée soit au travers du K_d soit au travers de la constante inhibitrice 50% (CI_{50} ou IC_{50} dans la version anglophone).

1.3.1. Considérations thermodynamiques des interactions sucre/lectine

Tout d'abord, rappelons certaines notions thermodynamique concernant une interaction ligand/récepteur avant d'aborder plus précisément des liaisons présentes dans les interactions étudiées.

Afin de trouver le(s) meilleur(s) ligand(s) (glycoclusters dans notre cas) pour un récepteur donné (dans notre cas une lectine cible), il est nécessaire d'étudier les interactions spécifiques existant entre le glycocluster et la poche de fixation de la lectine. La fixation d'une lectine (L) à un glycocluster (G) est régie par la simple *Équation 1-1*. La formation du complexe [LG] peut être décrite par sa constante d'association K_a (en mol⁻¹) ou de dissociation $K_d = 1/K_a$ (en mol) (*Équation 1-2*). K_a est également égale à k_1/k_2 .



$$K_a = \frac{[LG]}{[L][G]} \quad (\text{Équation 1-2})$$

Comme toute constante d'équilibre, K_a est liée à la variation d'enthalpie libre standard de la réaction de liaison (ΔG_o en kcal.mol⁻¹) comme indiqué par la loi de Van't Hoff (Équation 1-3) où T= température en degré Kelvin (°K), R= constante des gaz (0,00198 kcal.mol⁻¹.K⁻¹ =8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹).

$$\Delta G = -RT \ln(K_a) \quad (\text{Équation 1-3})$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Équation 1-4})$$

L'enthalpie libre (ΔG) d'un système dépend à la fois de l'enthalpie (ΔH) et de l'entropie (ΔS) (Équation 1-4). Plus l'affinité est forte, plus ΔG est négatif sachant que pour des réactions spontanées le ΔG est négatif (Atkins 1990). La variation d'enthalpie est reliée à la variation d'énergie interne et donc à la formation (ou rupture) de nouvelle(s) liaison(s). La variation d'entropie est liée à la variation de l'ordre dans le système. L'état d'équilibre indique le moment où le système aura minimisé son enthalpie (ΔH) et son enthalpie libre (ΔG) mais maximisé son entropie (ΔS) de réaction.

Bien que la spécificité de chaque lectine pour les sucres soit grande, les interactions sucre/lectine sont connues pour être relativement faibles lorsqu'il s'agit d'un glucide monovalent (K_d de l'ordre de grandeur de quelques μM à quelques mM). Cette faible affinité est une conséquence de la faible profondeur de la poche de liaison des lectines qui permet au solvant d'atteindre puis de déstabiliser les liaisons du complexe sucre/lectine (Ernst and Magnani 2009). Plusieurs approches sont possibles pour améliorer l'affinité entre la lectine et un ligand synthétique comme par exemple stabiliser le complexe formé via de nouvelles interactions de type hydrogènes, électrostatiques ou hydrophobes-hydrophobes). Ceci permet d'augmenter la contribution enthalpique du complexe formé (Ambrosi et al. 2005; Firon et al. 1987; Kim et al. 1998).

Deux exemples sont présentés *Figure 1-12*. Il s'agit de la structure cristalline du site de liaison entre PA-IL et le galactose d'une part et celle entre PA-III et le fucose d'autre part. Sur cette figure sont représentés les acides aminés impliqués dans la liaison ainsi que le ligand sucre spécifique. Le code couleur correspondant est défini comme suit : les atomes d'oxygène en rouge, d'azote en bleu, de carbone en noir et les ions calcium en rose. Les liaisons de coordination avec l'ion calcium sont représentées par des lignes pleines orange et les liaisons hydrogènes par des lignes pointillées vertes.

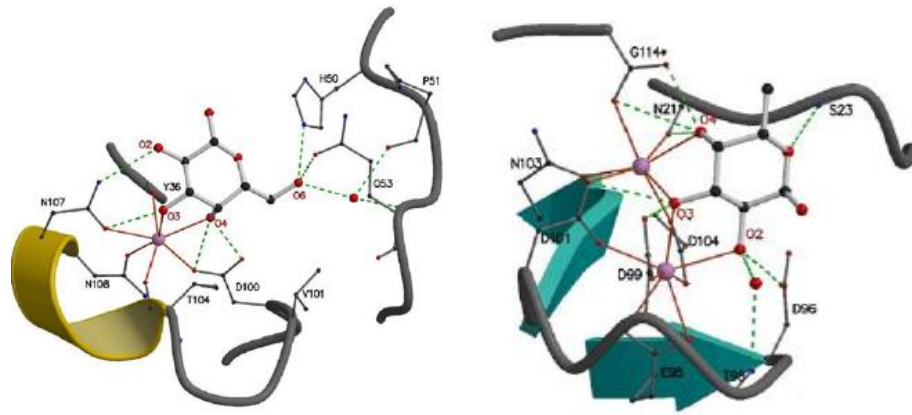


Figure 1-12 Structure cristalline du site de liaison PA-IL/galactose (gauche) et PA-IIL/fucose (droite). Représentation des interactions hydrogènes (lignes pointillés en vert) et les liaisons de coordinations avec l'ion Ca^{2+} (lignes orange) (Imberty et al. 2004)

Concernant PA-IL, les atomes d'oxygène numéro 3 et 4 (O_3 et O_4) du galactose sont impliqués dans les liaisons de coordination avec l'ion Ca^{2+} . De plus, cette interaction galactose/PA-IL est stabilisée par six liaisons hydrogènes avec les acides aminés : l'asparagine 21 liée aux oxygènes numéro 2 et 3 (O_2 et O_3), l'acide aspartique lié à O_4 et les acides aminés histidine 50 et glutamine 53 liés à O_6 . D'autre part, concernant PA-IIL, les atomes d'oxygène numéro 3 et 4 (O_3 et O_4) du fucose sont impliqués dans les liaisons de coordination avec les deux ions Ca^{2+} . Cette interaction fucose/PA-IIL est stabilisée par cinq liaisons hydrogènes avec les acides aminés : l'acide aspartique 96 lié à l'oxygène numéro 2 (O_2), l'acide aspartique 99 et l'asparagine 103 liés à O_3 , la glycine 114 et l'asparagine 21 liées à l'oxygène numéro 4 (O_4) et l'acide aminé sérine 23 lié à O_6 .

Une autre approche pour améliorer l'affinité sucre/lectine est de pré-orienter le ligand avant son interaction avec la lectine ce qui joue sur la composante entropique ou bien de synthétiser des ligands multivalents appelés glycomimétiques (ou glycoclusters). En effet, les lectines sont souvent des protéines multivalentes (plusieurs sites de liaisons par protéine). Leur affinité par résidu saccharidique avec un ligand multivalent peut être bien supérieure à celle observée pour le même sucre monovalent grâce à l'effet cluster. Dans le cadre de cette thèse, c'est à ce dernier type de ligand synthétique que nous nous sommes intéressés. Le but étant d'identifier des ligands synthétiques (inhibiteurs) de PA-IL, PA-IIL et FliD, capables d'inhiber leurs fonctions biochimiques lors de la formation du biofilm. Il est important de coupler les techniques de mesure d'affinité et de comparer les résultats obtenus car comme l'a précisé Lundquist (Lundquist and Toone 2002), l'ampleur de l'exaltation de l'affinité est très liée aux méthodes de mesures.

1.3.2. Multivalence

Le phénomène de multivalence est défini par la capacité d'une entité à former plusieurs liaisons. Par exemple, une lectine sera dite tétravalente si elle possède quatre sites de liaison avec un sucre (en bleu *Figure 1-13*). De la même manière un sucre (appelé glycocluster ou glycomimétique) sera tétravalent s'il possède quatre résidus saccharidiques (en marron *Figure 1-13*). Une interaction multivalente résulte de l'interaction entre deux molécules multivalentes. La *Figure 1-13* ci dessous illustre cette notion. On retrouve bien ici la notion d'un système « clé-serrure » à un échelon supérieur du site de liaison simple : les 4 résidus terminaux du sucre multivalent (en marron) doivent être en interaction avec les 4 sites de fixation de la lectine multivalente (en bleu).

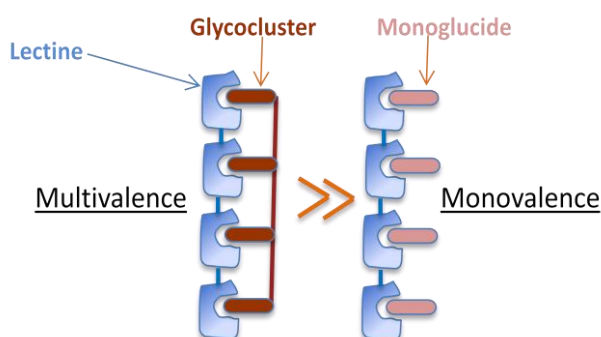


Figure 1-13 Comparaison d'une interaction tétravalente (affinité de l'ordre du nM) et de quatre interactions monovalentes (affinité de l'ordre du μ M) adapté de (Mammen et al. 1998)

Le terme « *Glycoside cluster effect* », c'est-à-dire effet cluster, a été proposé par (Lee and Lee 1995). Il traduit l'exaltation de l'affinité par résidu saccharidique d'une lectine multivalente (plusieurs sites de liaison) pour un sucre multivalent (glycocluster) relativement à une interaction monovalente. Cette exaltation est basée sur une contribution entropique et nécessite que la topologie des sites de liaison de la lectine et des glycoclusters soit « complémentaire ». Le glycocluster doit donc avoir une bonne configuration spatiale et une orientation adéquate pour avoir une forte affinité avec la lectine (Gestwicki et al. 2002). En imaginant un glycocluster parfaitement rigide qui serait parfaitement complémentaire de la lectine alors l'effet cluster serait maximal. Cependant, si l'on considère un glycocluster toujours parfaitement rigide, il est peu probable que celui-ci soit parfaitement complémentaire à la lectine. De fait, il faut donc éventuellement déformer les liaisons du glycocluster donc introduire une certaine flexibilité dans la molécule de manière à pouvoir le faire « matcher » avec la lectine. Néanmoins cela impliquerait un coût entropique « à payer » lors de l'interaction par la perte de degré de liberté. Le design d'un sucre multivalent de haute affinité nécessite donc d'optimiser sa topologie en fonction de la lectine ciblée tout en laissant

suffisamment de degrés de liberté. C'est donc un compromis à trouver entre les coûts entropique et enthalpique (Mammen et al. 1998). En raison des faibles constantes d'association observées pour les ligands monovalents, la synthèse de ligands multivalents a effectivement permis de tirer partie de « l'effet cluster » (Chabre et al. 2011).

1.3.3. Inhibition des lectines de PA par des glycosides multivalents

Les glycomimétiques ou glycoclusters sont souvent constitués de mono ou disaccharides mimant la partie reconnue par la lectine et sont souvent couplés à un aglycone* (groupement non-glucidique).

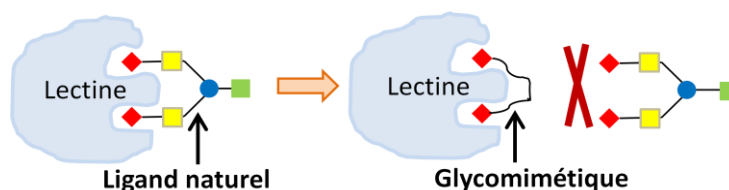


Figure 1-14 Représentation de l'action d'un glycomimétique (ou glycocluster)

De nombreuses équipes travaillent sur la synthèse de glycoclusters : certains dirigés contre le virus Influenza (Carbain et al. 2009; Islam and Von Itzstein 2008), d'autres contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Gorska et al. 2009) ou contre la lectine *Concanavaline A* (Gestwicki et al. 2002; Huang et al. 2011) ou encore contre la bactérie *Escherichia coli* (Sharon 2006) ou la maladie infectieuse du paludisme (Seeberger 2008).

Plusieurs équipes travaillent sur des clusters dirigés contre PA-IL et PA-IIL. L'aglycone peut être une protéine (Zhang et al. 2010), une molécule organique (Andreini et al. 2010; Cecioni et al. 2009; Consoli et al. 2011; Marotte et al. 2007), une nanostructure (Reynolds et al. 2012), un dendrimère* (Chabre et al. 2011; Johansson et al. 2011; Kadam et al. 2011; Kolomiets et al. 2009), un polymère (Otsuka et al. 2010), etc... Plusieurs inhibiteurs monovalents et multivalents de PA-IL et PA-IIL sont comparés grâce à leurs K_d et IC_{50} (Tableau 1-5 et Tableau 1-6).

	K_d (μM)	β	IC_{50} (μM)		β	Référence
	ITC		ELLA	SPR		
Mono-Galactose	50					(Blanchard et al. 2008; Nurisso et al. 2010)
Mono-Galactose	150	1		72	1	(Cecioni et al. 2009)
Calixarène 29	0,176	852		0,5	144	
Mono-Galactose	150	1		63,5	1	(Cecioni et al. 2011)
Calixarène 15	0,14	1071		0,8	79	
Mono-Galactose			0,04		1	(Imberty et al. 2004)
Phenyl- β -Galactose			$0,7 \times 10^{-3}$		57,1	
Mono-Galactose	94	1	190		1	(Chabre et al. 2011)
Gal-Ph	35	2,7	170		1,1	
Gal-OMe-Ar	246	0,38	68		2,3	

Tableau 1-5 Comparaison des K_d et IC_{50} de plusieurs galactoclusters sur PA-IL

	K_d (μM)	β	IC_{50} (μM)		β	Référence
	ITC		ELLA	SPR		
Mono-Fucose			$0,25 \times 10^{-3}$		1	(Mitchell et al. 2002)
Fuc-GlcNAc			$0,07 \times 10^{-3}$		3,6	
Mono-Fucose	2,9	1				(Imberty et al. 2008)
Fuc-GlcNAc	0,21	13,8				
Mono-Fucose	2,9	1				(Imberty et al. 2005)
3-fucosyllactose	0,37	7,8				
Mono-Fucose			$0,25 \times 10^{-3}$		1	(Imberty et al. 2004)
Lacto- <i>N</i> -Fucose			$0,05 \times 10^{-3}$		5	
Mono-Fucose	2,9	1				(Sabin et al. 2006)
Fuc- α -Me	0,43	6,7				
Mono-Fucose			11		1	(Johansson et al. 2011)
Fuc-D2			0,14		78,6	

Tableau 1-6 Comparaison des K_d et IC_{50} de plusieurs fucoclusters sur PA-IIL

Deux exemples de glycoclusters sont présentés sur la *Figure 1-15*. Au meilleur de nos connaissances, à ce jour, aucun inhibiteur pour PA-IL ni PA-IIL ni FliD n'a été envoyé en étude clinique.

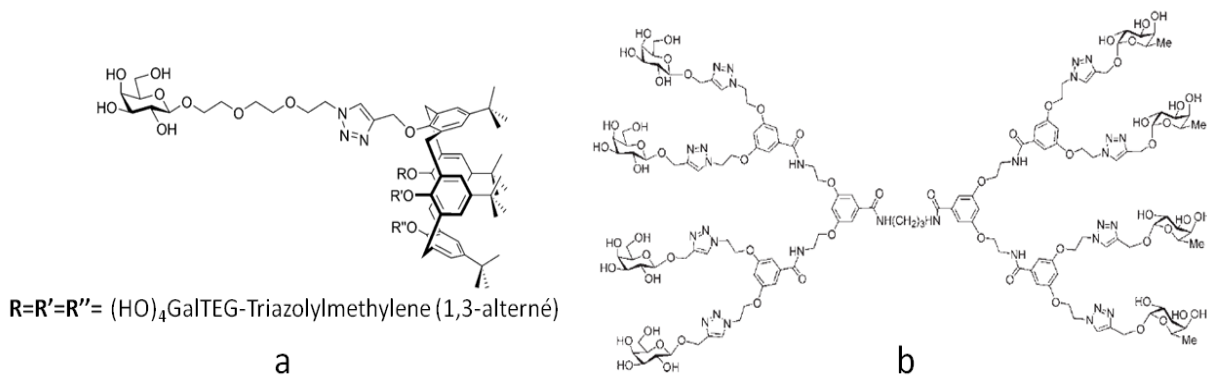


Figure 1-15 Exemples de glycoclusters dirigés a) contre PA-IL, avec 4 galactoses en résidus terminaux (Cecioni et al. 2009) et b) contre PA-IL et PA-IIL, avec 4 galactoses et 4 fucoses en résidus terminaux (Imberty et al. 2008)

L'étude d'une librairie de glycoclusters, synthétisés à l'institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM ; Montpellier, UMR 5247) et dirigés contre les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*, est le but de cette thèse. Etudier les interactions glycocluster/lectine fournirait une compréhension détaillée de l'affinité de *Pseudomonas aeruginosa* pour les sucres naturels des patients atteints de la mucoviscidose. Au final, trouver de nouveaux agents thérapeutiques (glycoclusters), possédant une sélectivité explicite pour PA-IL, PA-IIL et FliD, empêcherait les infections pulmonaires engendrées par ce pathogène.

1.4. Méthodes d'analyse des interactions glycoclusters/lectines

Différentes techniques d'analyses ont été mises en œuvre pour l'étude de ces interactions (Varki et al. 1999; Varki et al. 2009).

- des méthodes biophysiques comme la diffraction aux rayons X (DRX) (Bundle 1997), la microscopie à force atomique (AFM) (Sicard et al. 2012) ou la spectroscopie RMN (Bundle et al. 1994).

- des méthodes de cinétique et d'équilibre comme le titrage calorimétrique (ITC) (Gupta et al. 1996), le test ELLA, la chromatographie d'affinité (Kasai and Ishii 1978) ou encore l'électrophorèse capillaire (Franzen and Ostergaard 2012; Heegaard et al. 1998; Stettler and Schwarz 2005).

Ces techniques ont l'inconvénient de nécessiter une importante quantité de matériel biologique (de l'ordre de la mole ou millimole), sont chronophages et bas débit.

Ainsi, la grande diversité des sucres naturels et la difficulté de leur synthèse, aboutissant à de faibles rendements et donc de faibles quantités de matériels disponibles, ont ralenti les progrès dans la compréhension de ces interactions glycocluster/lectine. Dans le cas

des glycoclusters, en l'absence de modèle prédictif fiable, de la topologie optimale et du coût entropique, seule l'expérimentation permet d'accéder à ces informations. Cependant devant le nombre de possibilités topologiques, il est intéressant d'étudier ces interactions sur un système haut-débit et consommant peu de matériel de manière à porter l'effort de synthèse à grande échelle seulement sur les clusters les plus affins. Dans ce sens, le développement récent des nanotechnologies a ouvert de nouvelles frontières. Dans le domaine des biocapteurs apparaissent de nouvelles applications analytiques suite à l'intégration de biorécepteur qui se sont imposées comme une alternative aux méthodes classiques d'analyses d'interactions biologiques, lentes, fastidieuses et consommatrices de matériel biologique. Un biorécepteur permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif et sensible. De plus, les biocapteurs peuvent être multiplexés permettant ainsi l'analyse en parallèle de plusieurs interactions sucres/lectines simultanément avec très peu de matériels, comme par exemple avec les biopuces.

1.4.1. Le biocapteur

Selon l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un biocapteur peut être défini comme un dispositif qui utilise des réactions biochimiques spécifiques médiées par des enzymes isolées, systèmes immuns, tissus, organelles, ou cellules entières pour la détection de composés chimiques en utilisant un signal optique, électrique ou thermique.

De façon générale, la détection d'une espèce chimique ou biochimique ainsi que l'évaluation de sa quantité ou de sa concentration peuvent être faites soit à l'aide d'instruments d'analyse tels que divers spectromètres, soit à l'aide de capteurs. Le biocapteur est un dispositif qui, très schématiquement, est constitué d'un biorécepteur permettant la reconnaissance chimique ou biochimique, immobilisé sur un système dit transducteur (*Figure 1-16*), transformant l'interaction chimique ou biochimique en un signal physique mesurable avec une grande rapidité et une grande précision. L'espèce biomoléculaire constituant la couche bioréceptrice est appelée « **sonde** », alors que l'espèce à détecter est dite « **cible** ». La littérature et les nombreuses recherches consacrées aux biocapteurs s'inscrivent dans une logique de miniaturisation et d'intégration, de conceptions technologiques de faible coût et de faible consommation d'énergie; les propriétés analytiques escomptées sont l'utilisation en temps réel, la sélectivité, la sensibilité et la fiabilité (Thevenot et al. 2001).

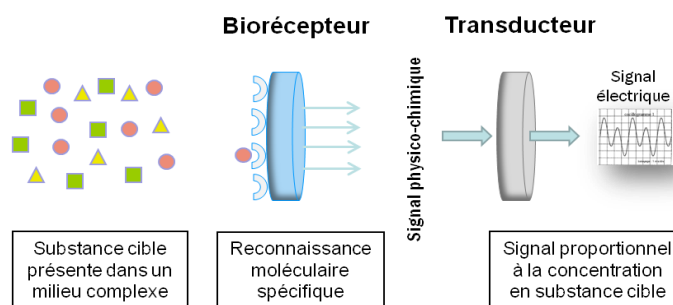


Figure 1-16 Schéma général d'un biocapteur

Une biopuce est constituée d'une surface plane (en verre, plastique, silicium, or...) sur laquelle les différentes sondes sont immobilisées en réseau ordonné. Suite à l'interaction entre les cibles et les sondes, la cartographie d'une grandeur physique choisie (la fluorescence par exemple) permet de déterminer les sondes ayant réagi avec la cible. On peut l'imager par une représentation quadrillée de sondes à la surface. Chaque type de sondes occupe une place bien définie sur la grille, désignée par son « spot ». Pour faciliter la lecture, les spots doivent être bien alignés, distants de la même longueur pour tous, parfaitement bien définis et avoir une taille uniforme. Chaque spot doit correspondre à un type de sondes réparties de manière homogène. La Figure 1-17 présente des défauts de puce altérant la qualité de lecture des interactions.

La technique de localisation des sondes la plus utilisée est la technologie des « spotters »*. Il est possible d'en distinguer deux modes : le mode contact par l'intermédiaire de fines aiguilles et le mode non contact (mode utilisé dans notre laboratoire) par un système de dépôt de gouttelettes (systèmes de projection de type microvannes ou piézoélectriques).

L'élégance que présente ce format vient du fait que chaque « spot » représente un essai indépendant et individuel. Ainsi, les quantités de matériel biologique nécessaire à la réaction peuvent être largement réduites. Près de 400 000 réactions indépendantes peuvent être réalisées en une fois sur la même puce dans le cas de puces à ADN*.

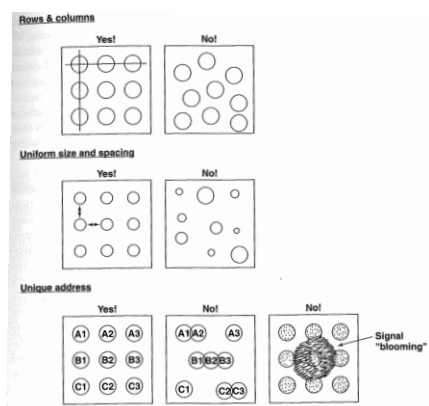


Figure 1-17 Représentation des défauts à ne pas obtenir sur une puce (Sчена 2002).

Le choix du matériau va dépendre de la technique de transduction. Par exemple, en résonance des plasmons de surface, les surfaces métalliques notamment l'or sont privilégiées. Ensuite, une méthode efficace d'immobilisation des sondes est essentielle pour la fabrication réussie des biopuces. La méthode d'immobilisation devra être compatible avec le matériau choisi d'une part et permettre l'immobilisation de la sonde tout en maintenant son activité biochimique d'autre part. L'immobilisation des sondes, étape primordiale, nécessite souvent une fonctionnalisation chimique de surface du substrat c'est-à-dire la création de fonctionnalités chimiques capables de réagir chimiquement avec la sonde. Elle détermine, en partie, les performances du microsysteme en termes de reproductibilité, uniformité et de spécificité (Schena 2002). En effet, le signal observé pour une sonde donnée est la convolution de l'affinité de celle-ci pour la cible, de son accessibilité (gêne stérique, orientation...), du maintien de la conformation de la sonde et de phénomènes liés au transport de masse. Or, seule l'affinité est d'un intérêt biochimique. Si l'on veut pouvoir comparer l'affinité de plusieurs sondes pour une cible, tous les autres paramètres doivent donc être égaux. A l'heure actuelle, il existe différents types de biopuces (*Figure 1-18*): puces à ADN, puces à protéines, puces à oligosaccharides. Dans l'idée du séquençage génomique, les puces à ADN ont été développées en premier puis suivirent les puces à protéines et enfin les puces à oligosaccharides (puces à sucres ou encore glycoarrays).

Ce travail de thèse a porté sur le développement d'une biopuce dont les sondes sont des glycoclusters/glycomimétiques et les cibles des lectines.

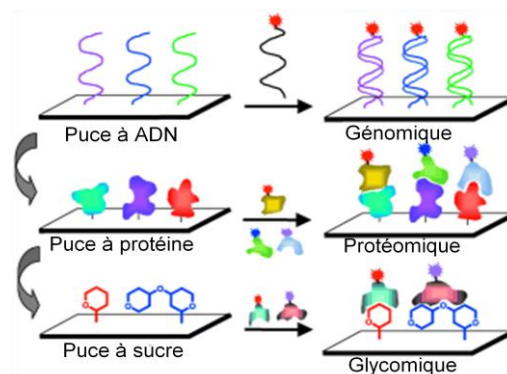


Figure 1-18 Les différentes technologies des biopuces (Shin et al. 2005)

En général, la fabrication d'une biopuce nécessite trois principales étapes. L'optimisation du système est un facteur clé à chaque étape :

- *La synthèse de la sonde.* Cela fait appel à des connaissances en biologie et virologie, en chimie organique et modélisation moléculaire.

- *L'immobilisation* de la sonde à la surface du matériau. Elle doit d'une part maintenir l'intégrité biochimique de la sonde et d'autre part garantir l'accessibilité de celle-ci pour la cible (*Figure 1-19*) et enfin limiter l'adsorption non-spécifique de la cible sur la surface. Cela fait appel à des connaissances en physico-chimie de surface et en synthèse chimique.

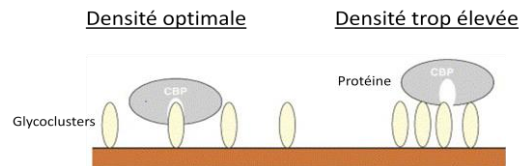


Figure 1-19 Représentation de l'effet de la densité de surface des sondes immobilisées sur la reconnaissance avec la cible (Dyukova et al. 2006).

- *La détection* des interactions grâce à des techniques de transduction avec ou sans marquage des cibles.

1.4.2. Le transducteur

Il est possible de regrouper les différents types de transducteurs utilisés dans la littérature selon leur principe physique : optique (mesurant des changements tels que l'absorption optique, la fluorescence ou l'indice de réfraction), mécanique (mesurant un changement de masse qui accompagne une réaction biologique : microbalance à quartz), électrochimique (basé sur le changement des propriétés électriques), thermique (mesurant le changement de température accompagnant une réaction endo ou exothermique : ITC) ou magnétique. Différents paramètres définissent la performance d'un transducteur : sensibilité, limite inférieure de détection, zone de linéarité. Le signal ainsi obtenu doit avoir un bruit de fond minimal pour assurer un seuil de détection bas et améliorer les performances du biocapteur (Imen 2009).

Bien que les biopuces utilisant la détection par fluorescence restent très utilisées (sur support dit « passif », qui n'intervient pas dans la mesure du signal), celles utilisant une détection sans marquage (sur support dit « actif ») sont de plus en plus recherchées (Charrier et al. 2011; Haake et al. 2000; Lin et al. 2006; Qavi et al. 2009; Yu et al. 2006). En effet, il est préférable d'éviter l'étape de marquage qui peut altérer l'activité de la molécule cible.

Le mode de transduction optique est soit basé sur l'utilisation de cibles marquées (fluorescence, chimiluminescence) soit sur une variation des propriétés optiques de l'interface solide/liquide ne nécessitant alors pas de marquage (SPR, ellipsométrie). Ainsi dans le cadre de cette thèse, la détection par fluorescence a principalement été utilisée mais un travail d'adaptation du microsystème à une détection sans marquage par résonance des plasmons de

surface (SPR) a également débuté. Dans la suite de ce chapitre, ces deux modes de transduction avec et sans marquage sont présentés suivis d'une revue de la littérature sur les glycoarrays.

1.4.2.1. *Méthode de détection optique directe avec marqueur fluorescent*

La spectroscopie de fluorescence est la méthode de référence pour l'étude des interactions biomoléculaires pour sa sensibilité, sa sélectivité et sa capacité d'analyse simultanée d'un très grand nombre de données. Cette méthode constitue la méthode de détection la plus fréquemment mise en œuvre avec les biopuces (Tan et al. 2004; Velasco-Garcia 2009). Elle est 1000 fois plus sensible que les méthodes spectrophotométriques (colorimétrie, absorbance).

Lorsqu'une substance est éclairée par une radiation lumineuse du domaine du visible, du proche ultraviolet, ou proche infra rouge, l'énergie absorbée peut être restituée sous la forme non radiative (énergie thermique), et/ou radiative par émission de lumière. La lumière émise est moins énergétique, donc décalée vers le rouge par rapport à la longueur d'onde d'excitation (Dejous 2005), c'est le décalage de Stokes. En fluorescence, les durées de vie de l'état excité sont de l'ordre de 1 nanoseconde à 10 millisecondes, alors qu'en phosphorescence, elle dépasse 100 millisecondes. En dehors des molécules possédant une fluorescence naturelle, beaucoup peuvent le devenir par conjugaison avec un marqueur fluorescent. Cette technique est largement utilisée, notamment pour la visualisation de tissus biologiques à l'aide de microscopes de fluorescence.

La détection par fluorescence consiste donc à associer la cible biologique à une molécule fluorescente (étape de marquage), puis à détecter sa présence en excitant le marqueur via une longueur d'onde adaptée et en lisant l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission. Pour cela, on utilise soit un microscope confocal, soit un scanner de fluorescence. Il existe plusieurs marqueurs fluorescents que l'on classe en fonction de leur longueur d'onde d'absorption et d'émission. Les plus couramment utilisés pour les applications biopuce sont cités dans le *Tableau 1-7* ci-dessous.

Fluorophores	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
Cy3 (Indodicarbocyanine3)	548	562
Cy5 (Indodicarbocyanine5)	646	664
Alexa Fluor 647	652	668
Fluorescéine	495	519

Tableau 1-7 Exemples de marqueurs fluorescents (Mujumdar et al. 1993; Sjoback et al. 1995)

Il faut toutefois noter que ces molécules ne sont pas toujours stables dans le temps, et que leur comportement peut être fortement perturbé par leur environnement (Marras et al. 2002). Un autre phénomène dit d'extinction (FRET*) entraîne une chute importante de la fluorescence. Ce phénomène est dû à l'interaction entre les molécules ayant un recouvrement spectral entre spectre d'émission et spectre d'absorption (Cy5 avec Cy3 ou Alexa 647 avec Cy3). Park et Shin (Park and Shin 2002), en marquant trois protéines avec trois marqueurs différents dérivés de la fluorescéine isothiocyanate (FITC), montrent la possibilité de détecter simultanément les interactions spécifiques sucres/protéines par la mise en contact d'une puce de 12 000 plots formés de 22 saccharides avec une solution mélangeant les différentes protéines.

Nous allons maintenant donner des exemples d'analyse d'interaction avec détection sans marquage. L'avantage par rapport à une détection avec marquage est que l'analyse peut être faite en temps réel et qu'il y a un gain de temps expérimental, et de coût, l'étape de marquage n'étant pas à réaliser. Cependant, la limite de détection est souvent supérieure à la fluorescence et dans les milieux complexes, il faut bien s'assurer que les variations du signal optique soient bien liées à la reconnaissance biologique spécifique.

1.4.2.2. *Détection sans marquage par résonance de plasmons de surface (SPR)*

La résonance de plasmons de surface (SPR) est un phénomène optique découvert pour la première fois par R.W.Wood (Wood 1902). Un plasmon de surface est une onde de densité de charge longitudinale le long de l'interface de deux milieux, où l'un est un métal et l'autre un diélectrique. La résonance d'un plasmon de surface (SPR) a lieu à cette interface métal / diélectrique (milieu de l'échantillon), pour un certain angle d'incidence θ de la lumière de polarisation. Elle a lieu lorsque la lumière traversant un milieu optiquement dense (exemple le verre) atteint l'interface entre ce milieu et un autre de plus bas indice (comme l'air ou l'eau), et est réfléchi dans le milieu dense. Alors que la lumière incidente est totalement réfléchi, une composante de cette lumière, l'onde ou champ évanescent, pénètre l'interface vers le milieu le moins dense d'une distance z équivalente d'une longueur d'onde, et cette onde diminue exponentiellement à partir de l'interface.

En d'autres termes, pour une interface d'indice de réfraction donné, pour une lumière incidente de longueur d'onde donnée, il existe un angle pour lequel le champ évanescent rentre en résonance avec les plasmons entraînant une extinction de la lumière réfléchi. Puisque les conditions de résonance dépendent de l'indice de réfraction, toutes variations

d'indice à l'interface entraînent des variations des conditions de résonance c'est dire de l'angle de couplage pour une longueur d'onde donnée. C'est sur ce principe qu'ont été construits les premiers bancs expérimentaux permettant de sonder les variations d'indice et d'épaisseur survenant à la surface d'un métal ((Homola et al. 1997)). Les métaux les plus adaptés sont l'argent, l'or, le cuivre et l'aluminium mais les plus employés sont l'or et l'argent: l'argent pour son pic de résonance pointu et l'or pour sa grande stabilité (De Bruijn et al. 1992). Dans le cas des biocapteurs, une interaction cible/sonde induit une variation d'indice à l'interface liquide/métal qui entraîne un changement des conditions de couplage. On peut ainsi suivre la cinétique de l'interaction soit en mesurant la variation de l'angle de résonance en fonction du temps, soit en mesurant la variation d'intensité de la lumière réfléchie en fonction du temps. Ainsi la technique SPR permet de suivre en temps réel, et sans aucun marquage, toute sorte d'interactions se déroulant sur une surface métallique ((Homola 2008; Wangkam et al. 2009)). En pratique, c'est la configuration de Kretschmann (Kretschmann and Raether 1968) qui est la plus développée pour les instruments SPR (*Figure 1-20*). Une source de lumière monochromatique polarisée est envoyée vers l'interface entre les deux milieux (métal-verre). Le verre est recouvert d'un film mince métallique (typiquement 50 nm d'or ou 40 nm d'argent).

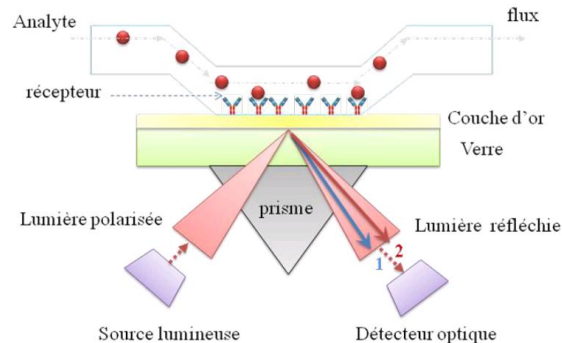


Figure 1-20 Principe de fonctionnement d'un capteur à résonance plasmonique de surface (SPR)

Le signal SPR exprimé en réflectivité est en fait une mesure indirecte de la concentration en masse à la surface de l'échantillon.

L'un des avantages de cette technique de détection est qu'elle permet donc un suivi en temps réel de la réaction biochimique à l'interface et ainsi de déterminer le k_{on} et k_{off} qui correspondent respectivement aux constantes cinétiques d'association et de dissociation. La détermination du k_{on} et du k_{off} permet de remonter à la constante de dissociation, le K_d qui est égale au rapport du k_{on} sur k_{off} (*Figure 1-21* et *Figure 1-22*). Cependant, cette relation est vérifiée si la cinétique de réaction n'est pas limitée par le transport de masse.

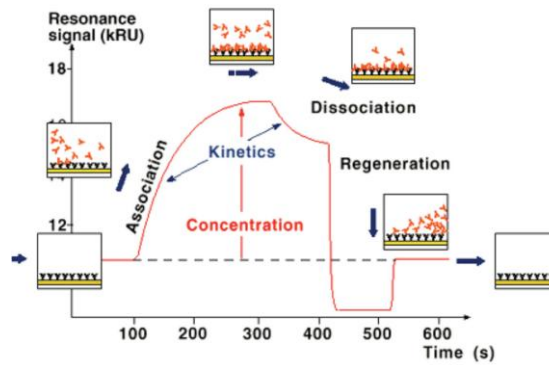


Figure 1-21 Cinétique d'une détection par SPR (Dejous 2005)

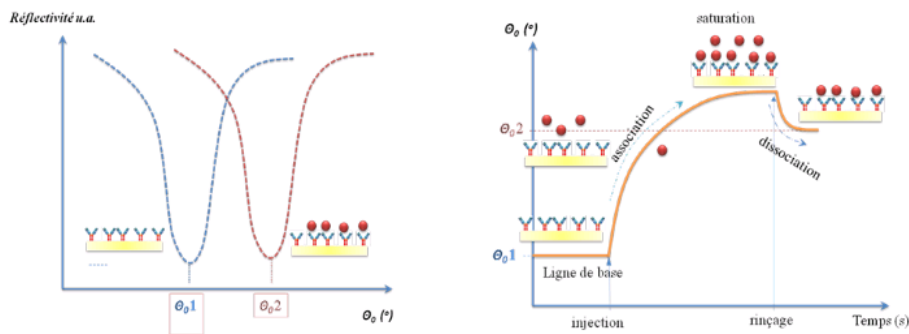


Figure 1-22 Réponses d'un capteur à SPR : A) réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de la source par rapport à la surface, B) suivi de l'angle de résonance en fonction du temps

Sur ce principe, le système commercial de loin le plus utilisé est le Biacore* dont les supports sont constitués d'une surface de verre recouverte d'une couche d'or fonctionnalisée avec un biopolymère de type dextran carboxyméthyle et tapissée de streptavidine (McDonnell 2001). Un circuit microfluidique en contact avec cette interface permet d'injecter les analytes.

Plusieurs exemples dans la littérature illustre l'utilisation de la SPR pour la mesure des interactions glycocluster lectines bactérienne. Cecioni et al. ont étudié l'affinité de glycocluster de galactose basé sur des calix-4- arene pour PA-IL (Cecioni et al. 2009). Lors de ces études, ils ont mesuré par SPR l'IC₅₀ de ces glycoclusters à savoir la concentration en glycocluster capable d'inhiber 50% de l'interaction entre PA-IL et une surface couverte par des galactoclusters. Cependant dans leur cas, il ne s'agissait pas d'une biopuce, donc la mesure des IC₅₀ n'était pas simultanée et d'autre part une quantité importante de matériel (glycocluster) était nécessaire pour conduire cette étude (de 0.14 à 18 µmol).

Pour sonder une biopuce qui comporte donc un grand nombre de plots et donc de points de mesure différents, la technique utilisée est l'imagerie de la résonance des plasmons de surface (SPRi) qui a été largement étudiée au cours des vingt dernières années, et s'est révélée être une technique assez puissante pour l'étude de l'interaction d'un anticorps avec un

antigène, de l'interaction protéine/ADN et de l'hybridation de l'ADN (Mannelli et al. 2006; Wang et al. 2004). La limitation principale de cette technique est qu'il est difficile de miniaturiser le système puisque l'appareillage externe n'est pas négligeable et que cette technologie coûte cher. Mais c'est un équipement de haute performance qui présente des résultats de grande qualité grâce à son logiciel d'analyse des données.

1.4.2.3. *Détection sans marquage par Ellipsométrie*

L'Ellipsométrie consiste à mesurer les modifications d'amplitude et de phase subies par une lumière polarisée (onde monochromatique), avant et après réflexion à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents (Demirel et al. 2008). Ces mesures donnent des informations sur l'épaisseur et l'indice de réfraction d'une couche adsorbée en surface (Dejous 2005) (détection de variations d'épaisseur de l'ordre de l'angström pour une couche monoatomique). Bien que cette technique soit non destructive et offre une large gamme de mesure : ADN (Demirel et al. 2008), protéines (Siegel et al. 2009), elle reste difficilement intégrable et nécessite un équipement sophistiqué. L'interprétation des résultats fait appel à la modélisation qui reste complexe dans le cadre de la technologie des biopuces.

Nabok et al. ont pu constater que leur technique (Total Internal Reflection Ellipsometry : TIRE) était plus sensible que la SPR pour la détection de pesticides en développant un immunocapteur.

1.4.3. *Analyses d'affinités par des mesures quantitatives*

L'affinité peut être déterminée de manière qualitative en comparant la lecture de fluorescence directe de plusieurs glycoclusters vis-à-vis d'une lectine marquée. Il s'agit de conclure quant à l'interaction ou la non-interaction entre les deux entités. Néanmoins il a été montré qu'une mesure d'affinité qualitative ne suffisait pas (Gordus and MacBeath 2006; Liang et al. 2007). En effet, elle dépend du K_d (qui est l'information pertinente) mais également de la manière dont se comporte un glycocluster pendant l'analyse c'est-à-dire de la proportion en glycoclusters accessibles. Ainsi, l'information obtenue qualitativement utilisant une seule concentration en lectine peut être trompeuse. Ainsi la lecture de fluorescence directe permet d'effectuer un premier criblage mais des mesures quantitatives sont nécessaires afin d'affiner l'étude.

1.4.3.1. IC_{50} : Constante d'inhibition d'un complexe

L' IC_{50} traduit la concentration en inhibiteur (I) nécessaire pour inhiber 50% de l'interaction entre le récepteur (L= Lectine) et son ligand (G= Glycocluster). Ainsi, plus un glycocluster possède une forte affinité avec une lectine, plus son IC_{50} est grand.



Il existe plusieurs types de réaction d'inhibition (compétitive, incompétitive, noncompétitive, etc.) et pour chacune, une équation de Michaelis et Menton associée. Cheng et Prusoff ont proposé des formules pour relier l' IC_{50} aux autres paramètres cinétiques, dans le cas d'un inhibiteur compétitif (Cheng and Prusoff 1973) :

$$IC_{50} = K_d \left(1 + \frac{[G]}{K_m} \right) \quad (\text{Équation 1-7})$$

Avec $[G]$ = concentration en Glycocluster, K_d = coefficient de dissociation du complexe Glycocluster/Lectine et K_m = constante de Michaelis du système associé. L'industrie pharmaceutique utilise très souvent le paramètre IC_{50} pour des raisons pratiques lors de la comparaison de molécules actives contre un germe ou un virus. En effet, la valeur de l' IC_{50} permet d'obtenir une indication sur l'efficacité d'une molécule sans connaître précisément les autres paramètres pouvant influencer la réaction. Il est facile de comparer l'affinité pour un récepteur donné de plusieurs ligands synthétiques par rapport au même substrat. Néanmoins, les mesures de compétition (IC_{50}) sont très dépendantes de la technique utilisée et des conditions expérimentales (Kitov and Bundle 2003; Lundquist and Toone 2002). Dans l'idéal, il faudrait que la mesure ne dépende pas des conditions expérimentales. Il est donc très important de comparer les résultats obtenus par d'autres méthodes de mesures d'affinités comme la mesure de la constante de dissociation par exemple.

1.4.3.2. K_d : Constante de dissociation d'un complexe

L'affinité d'un ligand (G = Glycocluster) est définie comme sa capacité de fixation à un récepteur (L = Lectine). Le K_d traduit la proportion de G et L sous forme complexée ou libre à l'équilibre. Ainsi, plus un glycocluster possède une forte affinité avec une lectine, plus son K_d est petit.

Tout d'abord, définissons l'adsorption d'une substance ainsi que l'isotherme d'adsorption de cette substance. Les molécules en solution (soluté) peuvent être adsorbées sur une surface solide de deux manières : la physisorption (liaisons de Van de Waals, liaisons

hydrogènes ou électrostatiques avec des enthalpies d'adsorption de l'ordre de $-20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ou la chimisorption (liaisons covalentes avec des enthalpies d'adsorption supérieures à $-40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). C'est un phénomène qui aboutit à un équilibre entre la substance adsorbée et celle restant en solution. L'équilibre dépend du soluté, de la concentration en soluté et de la surface du corps adsorbant (Atkins 1990). Plusieurs lois décrivent le phénomène d'adsorption mais nous nous sommes intéressés à la loi de Langmuir. Cette loi peut s'appliquer sous certaines conditions appelées hypothèses de Langmuir :

- * Le recouvrement de la surface s'effectue en couche mono moléculaire et il n'y a pas de diffusion de surface.
- * Le nombre de sites d'adsorption à la surface du solide est fixe.
- * Ces derniers sont équivalents entre eux donc il n'y a pas de gênes stériques des molécules adsorbées sur deux sites voisins.
- * L'enthalpie d'adsorption est identique pour chaque site d'adsorption.
- * A l'équilibre, la vitesse d'adsorption est égale à la vitesse de désorption

Plusieurs équipes ont mesurés des K_d à l'aide de glycoarrays. L'équipe de Smith *et al.* a mesuré par SPR un K_d de 45nM pour l'interaction entre la lectine jacalin et des galactoclusters immobilisés et un K_d de 178nM pour l'interaction entre la lectine concanavalin et des mannoclusters immobilisés (Smith *et al.* 2003). D'autres exemples de mesures de K_d réalisées sur glycoarray par SPR sont présentés par (Duverger *et al.* 2003). Concernant des mesures de K_d réalisées sur glycoarray par lecture de fluorescence plusieurs équipes ont adapté la loi de Langmuir à ce microsysteme. Gordus et MacBeath ont mesuré un K_d de 630nM pour l'interaction entre la protéine humaine Src homology 2 et des phosphopeptides EGFR-1016 immobilisés (Gordus and MacBeath 2006). Depuis, de nombreuses équipes travaillant également sur des microarrays utilisent cette méthode afin de mesurer une activité enzymatique (Park and Shin 2007), d'identifier différents inhibiteurs selon la densité des néoglycoprotéines de surface (Zhang *et al.* 2010) ou encore d'étudier les interactions d'une molécule antibiotique sur plusieurs peptides (Elbs and Brock 2003).

1.5. Les biopuces pour la glycobiologie : Glycoarrays

Bénéficiant du développement technologique des puces à ADN, les puces à oligosaccharides, ou glycoarrays, constituent une alternative permettant d'une part d'utiliser de très faibles quantités de matériel biologique (intéressant lorsqu'on a une faible quantité d'oligosaccharides) et d'autre part d'étudier en parallèle et dans des conditions similaires ou différentes un grand nombre de structures (Chevolot *et al.* 2007a; Shin *et al.* 2005). En

revanche, les biopuces à glycoclusters restent encore peu décrites dans la littérature. Nous allons voir les différentes avancées concernant les glycoarrays qui ont permis d'accélérer les études d'interactions sucres/protéines (*Figure 1-23*).

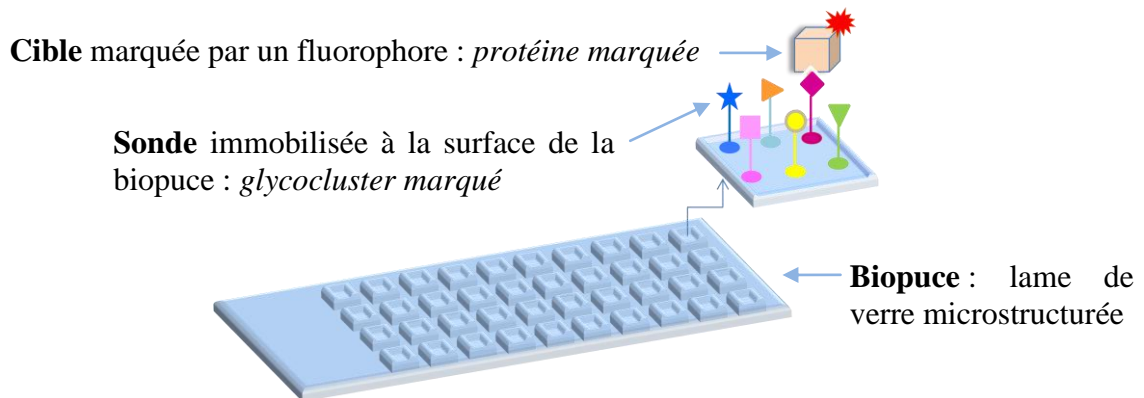


Figure 1-23 Schéma représentatif d'une biopuce à glycoclusters ou glycoarray

1.5.1. Applications des glycoarrays

A ce jour, les applications courantes des glycoarrays sont diverses et variées : on peut citer l'étude de la spécificité des lectines et des anticorps (Stevens et al. 2006; Wang 2003), la découverte de nouveaux oligosaccharides se liant spécifiquement aux protéines, l'étude de l'activité et de la spécificité des enzymes (Laurent et al. 2008a; Park and Shin 2007), l'application au diagnostic de certaines maladies (Ernst and Magnani 2009) et dans le développement d'un vaccin (Seeberger and Werz 2007; Werz and Seeberger 2005), l'étude de l'adhésion des cellules entre elles ou sur une membrane ou enfin l'identification de pathogènes (De Paz and Seeberger 2006; Laurent et al. 2008b).

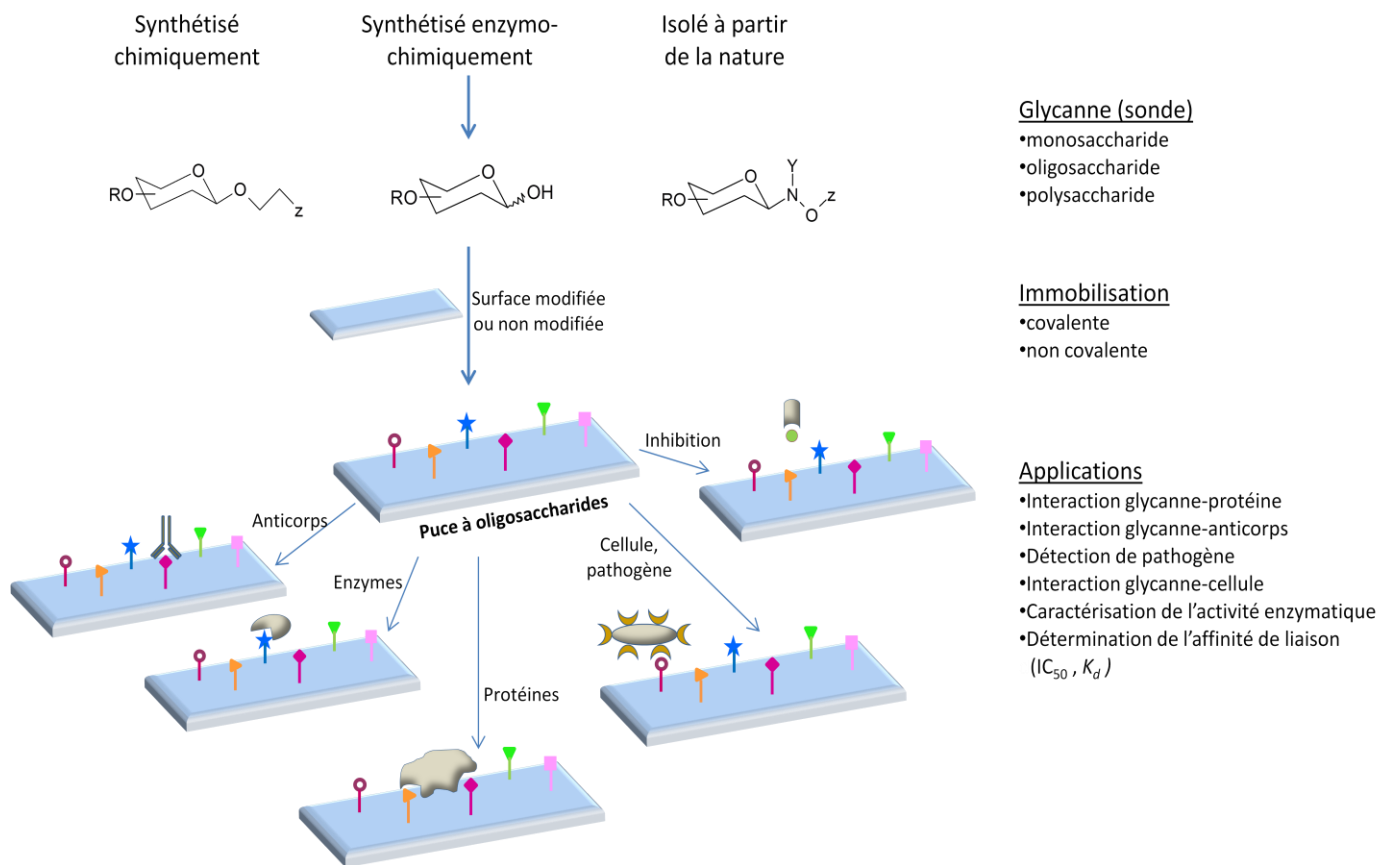


Figure 1-24 Schéma représentant la fabrication des glycoarrays et leurs applications pour la recherche biomédicale

1.5.2. Préparation des oligosaccharides

La première étape de la fabrication de la biopuce est d'avoir des sondes à immobiliser sur la surface (glycannes ou sucres). Il y a deux approches pour obtenir des glycannes : la première est leur isolation à partir de produits naturels et la seconde est leur synthèse chimique ou enzymatique. L'approche pour obtenir des glycannes naturels isolés est limitée par la difficulté de les purifier et par les faibles rendements obtenus (Ernst and Magnani 2009; Feizi et al. 2003; Seeberger and Werz 2007). L'approche par la synthèse chimique permet d'obtenir toutes les combinaisons de glycannes possibles. C'est actuellement la méthode la plus courante mais elle prend du temps, reste très lourde si les étapes de synthèses sont multiples et demande beaucoup d'efforts pour de très faibles rendements parfois. C'est pourquoi des méthodes de synthèses automatiques sont en cours de développement (Morvan et al. 2007; Pourceau et al. 2008, 2009; Seeberger 2008). Dans le cadre des biopuces utilisant les glycoclusters comme sondes, ces derniers sont issus uniquement de la synthèse.

1.5.3. Immobilisation sur la puce

Une technique d'immobilisation efficace de la sonde sur la surface de la puce est déterminante. Afin que la sonde soit accessible pour les cibles de manière reproductible et fiable, son étape d'accrochage est primordiale. Cette étape est également très importante afin de maintenir l'activité biologique de la sonde à la surface de la puce. Ainsi, si la conformation spatiale des sucres est maintenue, la reconnaissance sucre/protéine selon le modèle « clef/serrure » fonctionne (Chevolot et al. 2007b; Dyukova et al. 2006).

Le choix du type de substrat (lame de verre, dextran ou nitrocellulose par exemple), de la méthode d'immobilisation (immobilisation non spécifique et non covalente, site-spécifique et covalente ou site-spécifique et non covalente) ainsi que le choix de la fonctionnalisation chimique de surface sont multiples. Le but est d'apporter à la surface de la puce des fonctionnalités chimiques faisant le lien entre le substrat (puce) et la sonde à immobiliser (sucre). Il existe un grand nombre de protocoles pour l'immobilisation des sucres comme en témoigne le *Tableau 1-8* ci-dessous qui résume de manière non exhaustive les différentes chimies utilisées.

		Substrat	Fonction chimique réactive de surface	Fonction chimique réactive introduite sur le sucre	Avantage	Inconvénient	Références
Glycannes non modifiés (sucre libre, naturel)	Immobilisation non covalente sur une surface non activée chimiquement	Nitrocellulose	/	/	*Aucune modification de surface ni de techniques chimique d'immobilisation nécessaire	*Le glycanne doit être de 3,3 à 2000kDa pour bien être adsorbé à la surface *Immobilisation non site-spécifique	(Wang 2003; Wang et al. 2002)
		Verre	/	/			(Carroll and Wang 2012)
		Polystyrène noir	/	/			(Willats et al. 2002)
	Immobilisation covalente sur une surface activée chimiquement	Verre	Hydrazine	/	*Aucune modification du glycanne nécessaire et immobilisation efficace quelque soit la taille du glycanne non conjugué *Bonne présentation et orientation du glycanne *Configuration préservée	*Réactions non sélectives et non site-spécifiques *Ancrage réalisé sur n'importe quelle position du sucre *Peut détruire la structure du glycanne *Faible efficacité d'immobilisation	(Zhou et al. 2012; Zhou and Zhou 2006)
		Polymère	Cellulose photoactivable	/			(Sharma et al. 2010)
		Or	Hydrazide (via thiol)	/			(Poplewell et al. 2009)
		Verre	Amine Aminooxy Hydrazine	/			(Park et al. 2009a; Shin et al. 2005; Zhou et al. 2009)
Glycannes conjugués chimiquement	Immobilisation non covalente sur une surface non activée chimiquement	Nitrocellulose	/	Amino-lipides	*Aucune modification de surface ni de techniques chimique d'immobilisation nécessaire *Immobilisation non site-spécifique	*Deux réactions chimiques nécessaires pour lier le glycanne à l' amino-lipide	(Feizi and Chai 2004)
		Polystyrène	/	Trityl			(Zou et al. 2008)
		Verre	Streptavidine	Biotine			(Bochner et al. 2005; Galanina et al. 2003; Imberty et al. 2008)
		Or	Streptavidine	Biotine			(Linman et al. 2008)
		Verre	/	Fluor			(Ko et al. 2005; Mamidyala et al. 2006)
	Immobilisation covalente sur une surface activée chimiquement	Or	Thiol	Maléimine	*Augmentation de l'interaction glycanne-protéine *Immobilisation site-spécifique		(Park et al. 2004; Ratner et al. 2004)
		Or	Hydrazine	Glycanne natif			(Laurent et al. 2008c; Zhi et al. 2008)
		Verre	Amino groupe	Amine			(Blixt et al. 2004; Park et al. 2009b; Seeberger et al. 2006; Seeberger and Werz 2007; Seo et al. 2010)
		Verre	Epoxyde	Hydrazide			(Lee and Shin 2005; Park and Shin 2007)
		Verre	Phosphine	Azide			(Kohn et al. 2003)
		Verre	Alcyne	Azide			(Bryan et al. 2004; Fazio et al. 2002)
		Polymère	Amine	Thiazolidine Aminooxy			(Guillaumie et al. 2002)
		Dextran	Alcool	Diazirine			(Angeloni et al. 2005)

Tableau 1-8 Principales méthodes de greffage chimiques sur les glycoarray

1.5.4. Méthodes de fabrication et d'utilisation du glycoarray choisies dans le cadre de la thèse

Dans le cadre de cette thèse, deux types de lames ont été choisis en fonction du mode de détection utilisé : la lame de verre et la lame d'or. La lame de verre est adaptée à la détection par fluorescence (bruit de fond faible et fonctionnalisation chimique du support par la chimie des silanes) tandis que la lame d'or est adaptée à la détection sans marquage par SPR (l'or et l'argent sont les candidats idéaux en tant que films métalliques pour une puce de SPR dans la région de la lumière visible. Bien que des films d'argent donnent un spectre de SPR plus distinct que l'or et qu'ils génèrent une stimulation hautement étalonnée, ce métal a tendance à être instable dans les milieux réactionnels. Des films d'or minces présentent ainsi un meilleur choix pour les applications de SPR en ce qui concerne des considérations de stabilité et de sensibilité).

Une stratégie basée sur l'utilisation de biomolécules conjuguées avec une étiquette ADN a été élaborée en collaboration avec l'institut Max Mousseron (UMR 5247 CNRS/université de Montpellier-I/II) et l'institut de chimie et biochimie moléculaire et supramoléculaire (UMR 5246 CNRS/université Claude-Bernard de Lyon-1/CPE). La synthèse développée par l'IBMM est basée sur une stratégie « Lego ». Cette synthèse supportée, rapide et flexible des glycoclusters a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatique à ADN et de la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire (« click chemistry »). Cette approche a permis d'introduire jusqu'à dix résidus monosaccharidiques sur le squelette phosphorylé avec différentes topologies (en peigne, antenne ou couronne). La représentation générale des glycoclusters synthétisés est présentée sur la *Figure 1-25*. Les propriétés physico-chimiques (balance lipophile-hydrophile, aromaticité, charge, longueur...), les distances entre les résidus terminaux et la topologie peuvent être ajustées afin de déterminer sur glycoarray les paramètres permettant d'atteindre la plus forte affinité pour les lectines PA-IL, PA-IIL ou FliD. Les squelettes phosphorylés présentant des topologies en antennes ou en peigne ont été obtenus en utilisant des diols couplés grâce à des cycles successifs de couplage basés sur la chimie des oligonucléotides (déprotection, couplage, oxydation, blocage...). Dans le cas de la topologie en antenne, ces diols sont dialkynés afin d'introduire de part et d'autre du squelette les résidus saccharidiques. Pour les structures en peigne, les fonctions alkynes sont introduites par amination oxydative des H-Phosphonates.

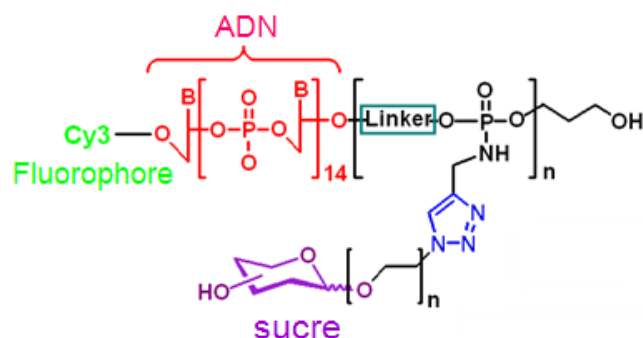


Figure 1-25 Représentation générale du glycocluster

1.5.4.1. Méthode d'immobilisation développée au laboratoire

En 2007, le consortium, formé par les équipes Oligonucléotides Modifiés (IBMM), Chimie Organique 2-Glycochimie (ICBMS) et l'équipe Chimie & Nanobiotechnologies (INL), a démontré plusieurs avantages de l'immobilisation spécifique des glycoclusters dirigée par l'ADN (immobilisation par DDI* : DNA Direct Immobilisation) (Chevolot et al. 2007a) :

- Plate-forme réutilisable
- Limite de détection faible (concentration en matériel biologique comprise entre 2 et 20 nM)
- Densité d'immobilisation contrôlée via l'utilisation d'un premier fluorophore incorporé à la structure des glycoclusters.
- Reconnaissance sucre/lectine pouvant se faire « en solution » ou « sur support » (partie 2.2.7 du *Chapitre 2*).
- Lecture du signal de fluorescence de la lectine marquée par un second fluorophore pour analyser l'interaction sucre/lectine

Ces travaux publiés en 2007 démontraient que des glycoclusters composés d'un ou trois résidus galactose terminaux séparés de l'ADN par des bras espaceurs DMCH et EG₄ étaient reconnus par la lectine végétale RCA₁₂₀*, spécifique du galactose. Néanmoins, la reconnaissance sucre/lectine par DDI n'avait pas été comparée à celle obtenue dans le cas de l'immobilisation covalente.

Cette méthode d'immobilisation a d'ailleurs été reprise par l'équipe de Tort pour immobiliser des stéroïdes sur un biocapteur pour une détection par SPR (Tort et al. 2012). D'autre part, une autre méthode utilisant des PNA* (acide nucléique peptidique) a été développée par l'équipe Huang *et al.* afin d'assembler de manière combinatoire une plus large gamme de structures (Huang et al. 2011; Sadhu et al. 2013).

1.5.4.2. Comparaison entre DDI et immobilisation covalente (DCI)

En 2009, Jing ZHANG a investi différents modes d'immobilisation de glycoclusters sur glycoarray et étudié leurs interactions avec la lectine végétale RCA₁₂₀ marquée avec le fluorophore Cy5. Quatre glycoclusters ont été testés : un témoin négatif comportant 3 mannoses en résidus terminaux (**1**) et trois galactoclusters trivalents identiques mais immobilisés soit par liaison covalente via un linker court (**2**) ou via un linker long (**3**), soit par DDI (**4**) (Figure 1-26), pouvant interagir avec la lectine RCA₁₂₀-Cy5.

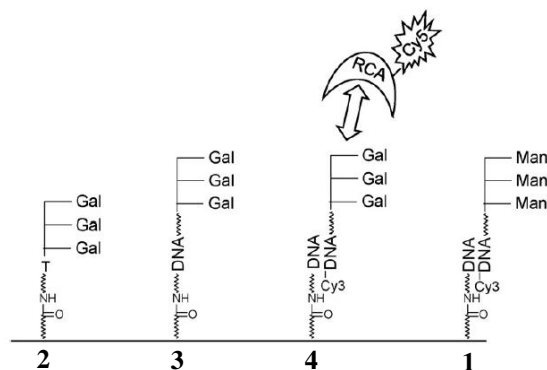


Figure 1-26 Représentation schématique de l'immobilisation des composés 1 à 4 et de l'interaction avec la lectine RCA₁₂₀ avec les résidus galactoses (Zhang et al. 2009a).

Les résultats de cette étude ont clairement montré que pour une concentration de glycoclusters de 0.5 μM dans la solution d'immobilisation et quelque soit la concentration en lectine-Cy5 (0.02, 0.2 ou 2 μM), le signal de fluorescence du Cy5 correspondant au galactocluster immobilisé selon la méthode (**4**) était supérieur à ceux observés dans le cas des DCI* (immobilisations covalentes) (**2** et **3**).

Cette étude a permis de valider la technique d'immobilisation par DDI comme une méthode plus efficace que la méthode covalente tout en utilisant très peu de matériel biologique (0.5 picomoles par puits c'est-à-dire environ 50 fois moins qu'en immobilisation covalente). Il se pourrait également que la rigidité de la double hélice de l'ADN permette au glycocluster d'être bien accessible et immobilisé de manière orientée à la surface du glycoarray. Une autre hypothèse proposée par Niemeyer pour les anticorps (Niemeyer et al. 1999a; Niemeyer et al. 1999b) serait que la densité de surface en glycoclusters soit plus élevée et plus homogène sur la puce du fait du caractère réversible de l'hybridation de l'ADN.

1.5.4.3. Reconnaissance spécifique sucre/lectine sur support et en solution

L'immobilisation dirigée par hybridation d'ADN (DDI) permet de conduire l'étape de reconnaissance de deux manières différentes : sur support (Figure 1-27) ou en solution (Figure 1-28). D'une part il a été montré qu'incuber un glycocluster et une lectine « en

solution » puis d'adresser les complexes formés sur le glycoarray donnait des résultats similaires que ceux obtenus lorsque les complexes sucre/lectine étaient formés « sur support » (Chevolot et al. 2007a).

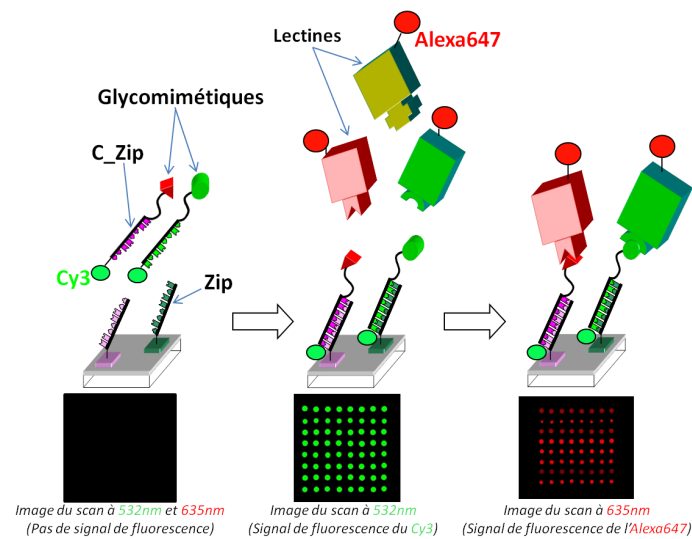


Figure 1-27 Schéma explicatif de la reconnaissance sucre/lectine « sur support » d'après (Chevolot et al. 2007a).

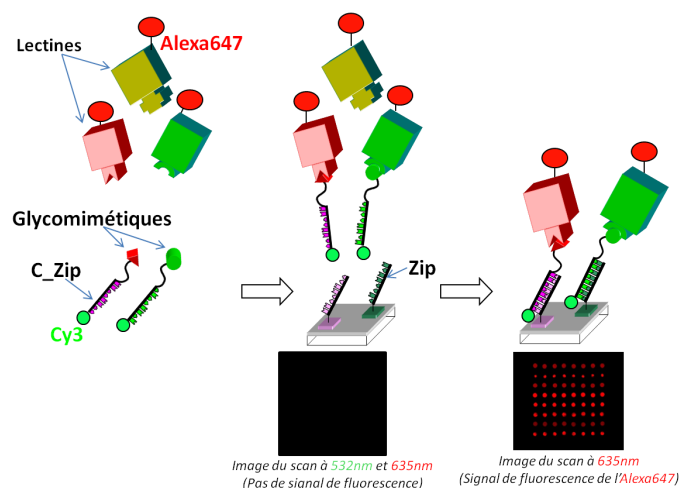


Figure 1-28 Schéma explicatif de la reconnaissance sucre/lectine « en solution » d'après (Chevolot et al. 2007a).

D'autre part, il a été montré avec un modèle simple qu'il était possible d'étudier l'affinité en solution de mélange de glycoclusters. On rappelle que PA-IIL et RCA₁₂₀ sont deux lectines spécifiques du fucose et galactose, respectivement. Une solution constituée d'un mélange de galactoclusters et de fucoclusters, chacun portés par une séquence ADN différente, a été incubée soit avec RCA₁₂₀, soit avec PA-IIL soit avec les deux lectines (Figure 1-29). Les complexes lectine/cluster, formés en solution, se sont bien immobilisés spécifiquement sur la biopuce selon la séquence d'ADN portée par le glycocluster (Zhang et al. 2009b).

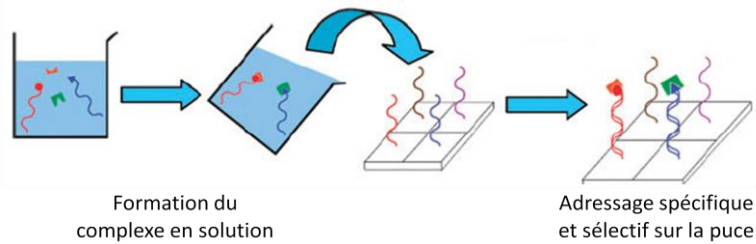


Figure 1-29 Mélange de 2 lectines (RCA_{120} et PA-IIL) avec les 2 sucres correspondants, portés par 2 séquences ADN différentes (suce1-C_Zip1.1 et suce2-C_Zip1.2). Formation en solution des complexes sucre/lectine puis hybridation spécifique des complexes sur la biopuce (Zhang et al. 2009b).

L'adsorption non spécifique des lectines sur la surface de la puce reste faible car le signal de fluorescence observé sur les témoins négatifs est comparable à celui du bruit de fond. Au final, en une expérience, deux affinités sucre/lectine ont été étudiées. Ce résultat montre la possibilité d'effectuer une étude multiplexée d'affinité en criblant plusieurs glycoclusters sur une lectine, à condition de trouver un ensemble de nouvelles séquences ADN spécifiques, sélectives et ayant un même rendement d'hybridation dans des conditions similaires.

1.6. Objectif de la thèse

Dans ce premier chapitre nous avons vu que l'infection chronique des voies respiratoires par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est la principale cause de morbidité et de mortalité dans la plupart des patients atteints de la mucoviscidose. Cette infection chronique des poumons par PA est facilitée par les deux lectines solubles : PA-IL et PA-IIL et par la lectine flagellaire FliD. Ces lectines sont utilisées de façon astucieuse et se lient spécifiquement aux glycoconjugués présents à la surface de l'épithélium des voies respiratoires. Elles contribuent largement à la virulence de la bactérie. La sécrétion de mucus épais, insuffisamment hydraté qui s'en suit, est la cause de la défaillance du phénomène de clairance mucociliaire. Ce pathogène est difficile à éradiquer car d'une part PA a développé de nombreuses stratégies pour se protéger des défenses immunitaires de son hôte, et d'autre part possède une résistance naturelle et acquise à de nombreux antibiotiques. Rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques de lutte contre ce microorganisme devient donc une préoccupation majeure.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une stratégie pour lutter contre l'infection pulmonaire par PA serait d'interférer avec la fixation des bactéries à l'épithélium des voies respiratoires. L'équipe de *Hauber et al.* a étudié l'effet de l'inhalation d'une solution de fucose/galactose

pour bloquer les lectines. Les résultats de ce rapport montrent que la solution inhalée pourrait réduire l'inflammation locale dans les poumons mais dépend encore des patients (Hauber et al. 2008). Dans le même esprit que ces travaux, en collaboration avec des chimistes de différents laboratoires, l'objectif de cette thèse a été la recherche d'inhibiteurs (glycomimétiques/glycoclusters) possédant une meilleure affinité pour les lectines PA-II, PA-III et FliD que les ligands naturels. Le but étant de bloquer l'interaction lectine/sucre grâce à ces inhibiteurs qui entreraient en compétition avec les ligands naturels (sucres). Ainsi il y aurait inhibition de l'adhésion de la bactérie sur les parois pulmonaires et donc l'infection serait bloquée.

Pour cela nous avons développé un glycoarray afin de mesurer qualitativement (mesure de fluorescence directe : FI₆₃₅) et quantitativement (IC₅₀ et K_d) l'affinité de plusieurs glycoclusters (bibliothèques de glycoclusters synthétisés chimiquement) vis-à-vis de ces lectines.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Dans ce deuxième chapitre sont listés les glycoclusters étudiés tout au long de cette thèse. Nous décrivons la construction de la plate-forme d'ancrage via l'ADN appelée « DNA Directed Immobilisation Glycoarray : DDI glycoarray » puis les différentes étapes afin d'analyser les interactions entre les glycoclusters sondes et les lectines cibles. Ce chapitre explique de manière plus détaillée et offre une vue d'ensemble de l'objectif de cette étude.

2.1. Bibliothèque des glycoclusters testés

Tous les glycoconjugués (glycoclusters) mentionnés dans cette thèse ont été synthétisés par nos collègues à l'IBMM de l'Université de Montpellier 2. Les procédures expérimentales de synthèse sont expliquées par Morvan et al. (Morvan et al. 2012). Nous présentons *Figure 2-1* la structure générale des glycoclusters : galactomimétiques et fucomimétiques (également nommés galactoclusters et fucoclusters).

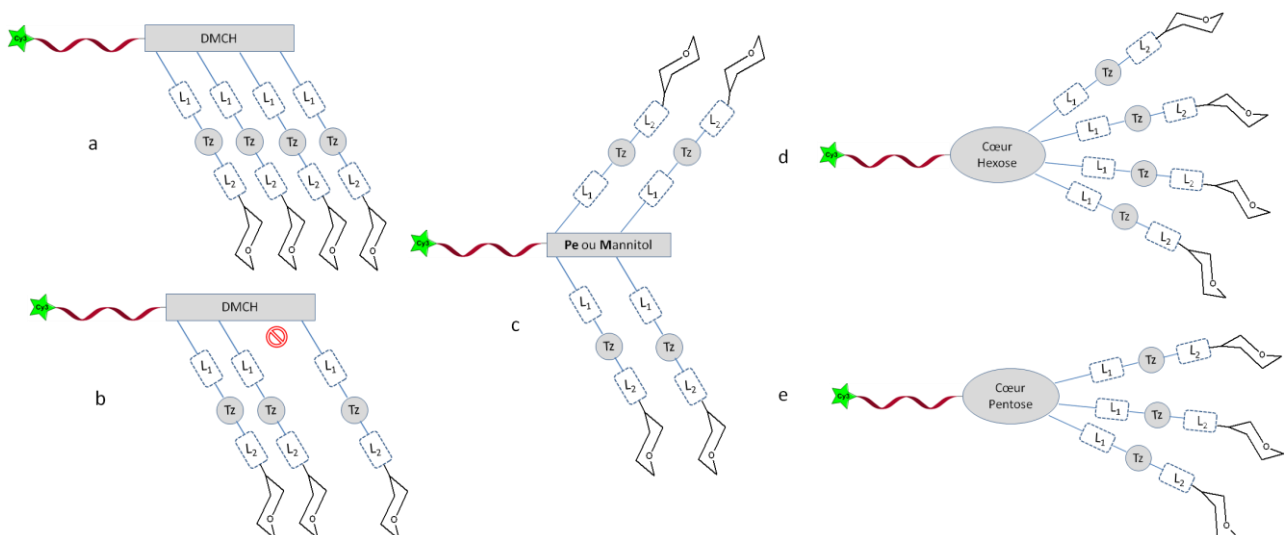


Figure 2-1 Structure générale des glycoclusters linéaires en peigne (a et b), antennés (c) et à cœur centré hexose (d) ou pentose (e) portés par un ADN-Cy3. L1=Linker 1 reliant le squelette phosphorylé (cœur) au triazole (Tz) et L2=Linker 2 reliant le triazole au résidu terminal

Tz= Triazole, DMCH=Diméthanolcyclohexane*, Pe= Pentaerythritol*

Tous les glycoclusters sont listés *Tableau 2-1* et *Tableau 2-2* en fonction de leur topologie, leur valence, la nature de leur linker L1 et L2 et de leur queue ADN associée. Leur structure développée est présentée en Annexe 1. Dans l'étude effectuée sur certains facteurs de virulence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (les lectines PA-II, PA-III, FliD), quatre familles de glycoclusters ont été évaluées :

- 1) Les linéaires en peigne avec un nombre de résidus terminaux variant de 1 à 5.
- 2) Les linéaires anténés avec 4, 5, ou 10 résidus terminaux.
- 3) Les cœurs centrés pyranose (ou bien hexose*) : Mannose, Galactose, Glucose avec 4 ou 8 résidus terminaux.
- 4) Les cœurs centrés furanose (ou bien pentose*) : Arabinose, Ribose, Xylose avec 3 résidus terminaux.

Les différentes séquences ADN présélectionnées sont listées *Tableau 2-3*. Ces dernières sont toutes marquées par le fluorophore Cy3. Le témoin négatif utilisé sera un glycoconjugué ne possédant ni de galactose, ni de fucose en résidus terminaux. Il s'agit du tri-mannose (DMCH-MTz EG₃-Man)₃, ou encore nommé **1-(Man)₃** dans les chapitres 3 et 4. Ce dernier est porté par la séquence ADN simple brin Zip1.1.

2.1.1. Les Galactomimétiques ou galactoclusters

	Cœur	Nom	Valence	L1	L2	Zip code
	Mono					
1		(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₁ ou Gal ₁	1	M	EG ₃	Zip1.1
2		(Thme-MTz AcNAr-Gal) ₁	1	M	AcNAr	Zip1.1
3		(Thme-HexTz M-Gal) ₁	1	Hex	M	Zip1.1
	Linéaire en peigne					
4	DMCH-EG ₃	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₃	3	M	EG ₃	Zip1.1
5	"	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ou 2-(Gal)₄	4	M	EG ₃	Zip1.10
6	"	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₅	5	M	EG ₃	Zip1.1
7	DMCH-Ar	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₂ ou Gal ₂	2	M	AcNAr	Zip1.1
8	"	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₃	3	M	AcNAr	Zip1.1
9	"	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₄	4	M	AcNAr	Zip1.1
10	"	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₅	5	M	AcNAr	Zip1.1
11	"	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₁₁₀₁	3	M	AcNAr	Zip1.1
12	Thme-EG ₃	(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁻ ou 3-(Gal)₄³⁻	4	M	EG ₃	Zip1.7
13	"	(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ou 4-(Gal)₄	4	M	EG ₃	Zip1.8
14	"	(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁺ ou 5-(Gal)₄³⁺	4	M	EG ₃	Zip1.9
15	Thme-Ar	(Thme-hexNH ₂ -MTz AcNAr-Gal) ₃ ³⁺	3	Hex	AcNAr	Zip1.6

	Linéaire Antenné					
16	Pe-EG ₃	(Pe-MTz EG ₃ -Gal ₂) ₂ ¹⁻ ou 6-(Gal) ₄ ¹⁻	4	M	EG ₃	Zip1.11
17	"	(Pe-MTz EG ₃ -Gal ₂) ₂ ou 8-(Gal) ₄	4	M	EG ₃	Zip1.13
18	"	(Pe-MTz EG ₃ -Gal ₂) ₂ ¹⁺ ou 7-(Gal) ₄ ¹⁺	4	M	EG ₃	Zip1.14
19	Mannitol-Ar	Mannitol-(proTz AcNAr-Gal) ₅	5	pro	AcNAr	Zip1.1
20	"	Mannitol-(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₅	5	EG ₂ M	AcNAr	Zip1.1
21	"	Mannitol[Thme(MTz AcNAr-Gal) ₂] ₅ ou Gal ₁₀	10	M	AcNAr	Zip1.1
	Hexose					
22		Man(proTz DMCH-Gal) ₄	4	pro	DMCH	Zip1.1
23		Man(proTz EG ₂ -Gal) ₄	4	pro	EG ₂	Zip1.1
24		Man(proTz pro-Gal) ₄	4	pro	Pro	Zip1.1
25		Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄	4	pro	EG ₃	Zip1.1
26		Man(proTz AcNAr-Gal) ₄ ou Gal ₄	4	pro	AcNAr	Zip1.1
27		Glc(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	pro	AcNAr	Zip1.1
28		Gal(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	pro	AcNAr	Zip1.1
29		Man(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	Hex	AcNAr	Zip1.1
30		Glc(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	Hex	AcNAr	Zip1.1
31		Gal(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	Hex	AcNAr	Zip1.1
32		Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	EG ₂ M	EG ₃	Zip1.1
33		Man(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₄	4	EG ₂ M	AcNAr	Zip1.1
34		Man(EG ₃ MTz AcNAr-Gal) ₄	4	EG ₃ M	AcNAr	Zip1.4
35		Man(EG ₄ MTz AcNAr-Gal) ₄	4	EG ₄ M	AcNAr	Zip1.4
36		Man[(proTz AcNAr-Gal) ₂] ₄ ou Gal ₈	8	pro	AcNAr	Zip1.1
37		Man[Thme(MTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	8	M	AcNAr	Zip1.1
38		Man(proTz BuT-Gal) ₄	4	pro	BuT	Zip1.1
39		Man(EG ₂ MTz BuT-Gal) ₄	4	EG ₂ M	BuT	Zip1.1
40		Man[Thme(MTz BuT-Gal) ₂] ₄	8	M	BuT	Zip1.1
	Pentose					
41		Ara(proTz AcNAr-Gal) ₃	3	pro	AcNAr	Zip1.4
42		Ara(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₃	3	EG ₂ M	AcNAr	Zip1.4
43		Xylo(ProTz AcNAr-Gal) ₃	3	pro	AcNAr	Zip1.5
44		Xylo(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₃	3	EG ₂ M	AcNAr	Zip1.5
45		Ribo(ProTz AcNAr-Gal) ₃	3	pro	AcNAr	Zip1.3
46		Ribo(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₃	3	EG ₂ M	AcNAr	Zip1.3

Tableau 2-1 Liste de tous les galactoclusters portés par une queue ADN.

Tz= Triazole, M= Méthyle, Pro= Propyle, Hex= Hexyle, BuT=Butyle-Thymine, AcNAr = Acéthyle-N-Phényle, DMCH=Diméthanocyclohexane, Thme= 1,1,1-(trishydroxyméthyl)éthane, Pe= Pentaerythritol, EG_{2/3/4}=Di/Tri/Tétra-éthylène glycol
 Man= Mannose, Glc= Glucose, Gal= Galactose, Ribo= Ribose, Xylo= Xylose, Ara= Arabinose

2.1.2. Les Fucomimétiques ou fucoclusters

	Cœur	Nom	Valence	L1	L2	Zip code
1		(DMCH-MTz EG ₃ -Man) ₃	3	M	EG ₃	Zip1.1
2		(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₃	3	M	EG ₃	Zip1.1
Mono						
3		(Thme-MTz EG ₃ -Fuc) ₁	1	M	EG ₃	Zip1.1
4		(Thme-HexTz M-Fuc) ₁	1	Hex	M	Zip1.1
Linéaire en peigne						
5	DMCH-EG ₃	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₂ ou Fuc ₂	2	M	EG ₃	Zip1.1
6	"	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	M	EG ₃	Zip1.1
7	"	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	M	EG ₃	Zip1.1
8	"	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	M	EG ₃	Zip1.1
9	"	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₁₁₀₁	3	M	EG ₃	Zip1.1
10	Thme-EG ₃	(Thme-hexNH ₂ -MTz EG ₃ -Fuc) ₃ ³⁺	3	Hex	EG ₃	Zip1.6
Linéaire Antenné						
11	Pe-EG ₃	(Pe-MTz EG ₃ -Fuc) ₂	4	M	EG ₃	Zip1.11
12	Mannitol-EG ₃	Mannitol-(proTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	pro	EG ₃	Zip1.13
13	"	Mannitol-(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	EG ₂ M	EG ₃	Zip1.14
14	"	Mannitol[Thme(MTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₅ ou Fuc ₁₀	10	M	EG ₃	Zip1.1
Hexose						
15		Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄ ou Fuc ₄	4	pro	EG ₃	Zip1.1
16		Glc(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	Pro	EG ₃	Zip1.1
17		Gal(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	Pro	EG ₃	Zip1.1
18		Glc(hexTz M-Fuc) ₄	4	Hex	M	Zip1.1
19		Gal(hexTz M-Fuc) ₄	4	Hex	M	Zip1.1
20		Man(hexTz M-Fuc) ₄	4	Hex	M	Zip1.1
21		Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	EG ₂ M	EG ₃	Zip1.1
22		Man(EG ₄ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	EG ₄ M	EG ₃	Zip1.4
23		Man[(proTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₄ ou Fuc ₈	8	pro	EG ₃	Zip1.1
Pentose						
24		Ara(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	pro	EG ₃	Zip1.4
25		Ara(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	EG ₂ M	EG ₃	Zip1.4
26		Xylo(ProTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	pro	EG ₃	Zip1.5
27		Xylo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	EG ₂ M	EG ₃	Zip1.5
28		Ribo(ProTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	pro	EG ₃	Zip1.3
29		Ribo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	EG ₂ M	EG ₃	Zip1.3

Tableau 2-2 Liste de tous les fucoclusters étudiés portés par une queue ADN.

2.1.3. Séquences ADN

Référence	Séquence ADN 5'→3'	% GC	Tm
Zip 1.1	5'-GTG AGC CCA GAG GCA GGG-(CH ₂) ₇ -NH ₂	72,0	58.3
Zip 1.2	5'-GCT AAT CCA ACG CGG GCC AAT CCT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	56.3
Zip 1.3	5'-GTG GAG GCA CCA AGC TTT- (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	58.6
Zip 1.4	5'- CCA AGC GAG GTG GCA TTT- (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	59.6
Zip 1.5	5'-CCA GCA GTG GAG AGC TTT - (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	57.5
Zip 1.6	5'-GCA GAG AGC GTG CCA TTT - (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	59.7
Zip 1.7	5'- TTC TGT TCT CAG TTT TCC TTT T- (CH ₂) ₇ -NH ₂	32,0	55.1
Zip 1.8	5'-AGT GGA GGT CAA CGA GCA ATT T - (CH ₂) ₇ -NH ₂	45,0	62.2
Zip 1.9	5'-AGG AGG AAC GCT CTA TCG CTT T -(CH ₂) ₇ -NH ₂	50,0	62.4
Zip 1.10	5'-TGT GGA CTT GGT TTC TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	39,0	50.6
Zip 1.11	5'-ATA AGT ATT GGA CAA CTT GTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	27,0	50.5
Zip 1.12	5'-GTG AAC GTT TCC TCG TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	44,0	52.5
Zip 1.13	5'-ACA GTT GTT GGC GGT TGC TTT T-(CH ₂) ₇ -NH=	45,0	53.9
Zip 1.14	5'-AAA ATA TCA TCT TTG GTG TTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	23,0	51.0

Tableau 2-3 Caractéristique des séquences ADN choisies pour l'étude. %GC et Tm calculés à partir du DINAMelt Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-melting>) avec $[Na^+]=137mM$ dans PBS_{1X}, $[CZip]=1\mu M$ et $T=37^\circ C$.

$$Tm = \frac{\Delta H}{\Delta H + R \ln\left(\frac{[C_Zip]}{2}\right)} \times 1000$$

avec $[Na^+]=137mM$ dans PBS_{1X}, $[CZip]=1\mu M$ et $T=37^\circ C$.

2.2. Développement de la plateforme d'ancrage par ADN

Le glycoarray, ou plateforme d'ancrage, est une lame de verre (Borosilicate, Nexterion D, Schott GMBH, Allemagne) sur laquelle on fonctionnalise chimiquement la surface afin d'ancrer le matériel biologique désiré (Chevolot et al. 2007a; Zhang et al. 2009a, 2009b). La réalisation de cette plateforme comporte 3 étapes réalisées à l'Institut des nanotechnologies de Lyon :

1. Fabrication des microréacteurs par photolithographie puis par gravure en phase liquide.
2. Silanisation conduisant à une surface fonctionnalisée chimiquement par des groupements NHS* à ester activés.
3. Immobilisation covalente des oligonucléotides modifiés avec un groupe amino (-NH₂). Simple brin d'ADN utilisé comme plateforme d'ancrage pour l'immobilisation des glycoconjugués synthétiques.



Figure 2-2 Photo et schéma de la biopuce (glycoarray). A) Lamme de verre microstructurée avec 52 microréacteurs ronds (2mm de diamètre) ou B) microstructurée avec 40 microréacteurs carrés (3mm de côté).

2.2.1. Fabrication de la plateforme microstructurée

La lame de verre (Borosilicate, Schott) est microstructurée au laboratoire par Dr.Yann CHEVOLOT par un procédé de lithographie suivi d'une gravure en phase liquide. Deux motifs ont été réalisés :

- Microstructuration avec 52 microréacteurs ronds (4 colonnes et 13 lignes), 2mm de diamètre, 65-100 μ m de profondeur avec moins d'1% de variation en profondeur par batch de gravure et pouvant contenir une goutte de 1 μ L (*Figure 2-2 A*).
- Microstructuration avec 40 microréacteurs carrés (4 colonnes et 10 lignes), 3mm de côté et espacés de 4 à 5mm, 70 μ m de profondeur et pouvant contenir une goutte de 2,5 μ L (*Figure 2-2 B*).

La fabrication des lames microstructurées est basée sur la technique développée par Mazurczyk et al (Mazurczyk et al. 2008a). Les différentes étapes sont schématisées *Figure 2-3*.

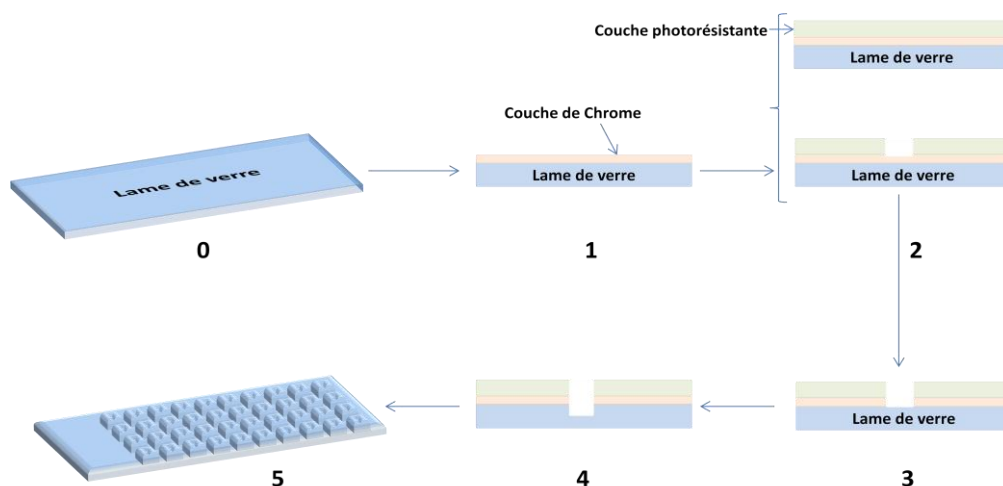


Figure 2-3 Explication du procédé pour la fabrication des microréacteurs. 0. lame de verre nue. 1. Dépôt de la couche de chrome. 2. Photolithographie. 3. Attaque du chrome. 4. Gravure du verre. 5. Élimination de la couche protectrice. Adapté de (Mazurczyk et al. 2008a).

2.2.2. Dépôt de la couche de chrome (1)

Les lames de verres sont lavées avec un détergent TDF₄ (Franklab SA, Billancourt, France), une solution Piranha fraîche (H₂O₂/H₂SO₄ : 2/3) pendant 10 minutes puis rincées à l'eau désionisée (18,2 MΩ) avant d'être séchées par centrifugation* à 1300 rpm* pendant 3minutes. Une couche de 150 nm de chrome est déposée sur la surface par pulvérisation magnétron (MRC822 system). Cette couche de chrome permet l'adhésion de la résine photosensible à la surface de la lame et la protège contre l'attaque par la solution de gravure. Le procédé est fait à une radiofréquence (RF) de 5 kW de puissance, la puissance réfléchie est de 2W et la tension de 2.6kV. Le flux d'argon est réglé à 50sccm et la pression de travail à 2.6 10⁻³ Torr.

2.2.2.1. Photolithographie (2)

La résine photosensible SPR 220 4.5 photoresist (Rohm Haas electronic materials, Lucerne, Suisse) est spin-coatée à 4 000 rpm pendant 30 secondes pour obtenir une fine couche de 4 μm d'épaisseur. Elle est ensuite chauffée à 115°C sur une plaque chauffante pendant 90 secondes. La photolithographie est réalisée par un masque aligneur Karl Suss MJB3 avec une illumination pendant 22 secondes. Les lames sont immergées dans un « MF26 A developer » pendant 1 minute puis rincées à l'eau désionisée (18,2 MΩ), séchées sous flux d'azote et recuites à 115°C pendant 2minutes.

2.2.2.2. *Gravure en phase liquide (3)*

L'attaque du chrome se fait avec une solution détergente oxydante (Merck, Darmstadt, Allemagne). C'est un mélange appelé BOE (Buffered Oxide Etchant) : 1/2/2, v/v/v : (7/1, acide fluoridrique/fluorure d'ammonium) / (37% d'acide hydrochlorique (HCl, Riedel de Haen, Seelze, Allemagne)) / (eau désionisée (H₂O, 18.2 MΩ)).

Les lames sont rincées à l'eau désionisée pendant 15min puis immergées pendant 75min à t.a. dans cette solution de gravure BOE fraîchement préparée. Les lames sont rincées à l'eau désionisée pendant 15min puis à l'acétone (Riedel de Haen), à l'éthanol (Sigma) et encore à l'eau désionisée afin d'éliminer tout résidu de couche photorésistante. La profondeur des micropuits est contrôlée par un profileur mécanique (Alfa-step 500 from KLA Tencor). (Mazurczyk et al. 2008b)

2.2.3. *Silanisation, déprotection et activation des lames de verre*

La silanisation se fait suivant le protocole développé par Dugas *et al.* (Dugas and Chevalier 2003; Dugas et al. 2004; Phaner-Goutorbe et al. 2011) (*Figure 2-4*). Les lames sont brièvement lavées au piranha pendant 20min, rincées à l'eau désionisée (4 fois 10min) puis séchées par centrifugation. Après chauffage sous un flux d'azote anhydre dans un réacteur fermé pendant 2h à 150°C, 250mL de pentane anhydre est ajouté à t.a. puis 300µl de *tert*-butyl-11-(diméthylamino)silylundecanoate. Après 2h d'incubation à t.a. sous un flux d'azote, le pentane est évaporé sous vide. Les lames sont chauffées à 150°C pendant une nuit, lavées au THF* puis rincées à l'eau désionisée et enfin séchées par centrifugation (3min à 1500 rpm).

Après la silanisation débute l'étape de déprotection des lames. C'est-à-dire que l'ester est transformé en son acide correspondant par la réaction de saponification utilisant l'acide formique (Riedel de Haen, Seelze, Allemagne). Cette hydrolyse acide se fait pendant 7h à t.a. sous faible agitation dans une vaisselle bien nettoyée au piranha. Dans un bain à ultrasons, les lames sont lavées 10min au THF anhydre puis 10min à l'eau désionisée puis séchées par centrifugation (3min à 1500 rpm).

Après la déprotection débute l'étape d'activation du groupement acide carboxylique avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (Riedel de Haen, Seelze, Allemagne) (0.1 M) et le di(isopropyl)carbodiimide (DIC) (Riedel de Haen, Seelze, Allemagne) (0.1 M) dans du THF anhydre pendant une nuit sous faible agitation à t.a. Dans un bain à ultrasons, les lames sont lavées 10min au THF anhydre puis 10min dans du dichlorométhane. Enfin, le dichlorométhane est évaporé à l'air libre.

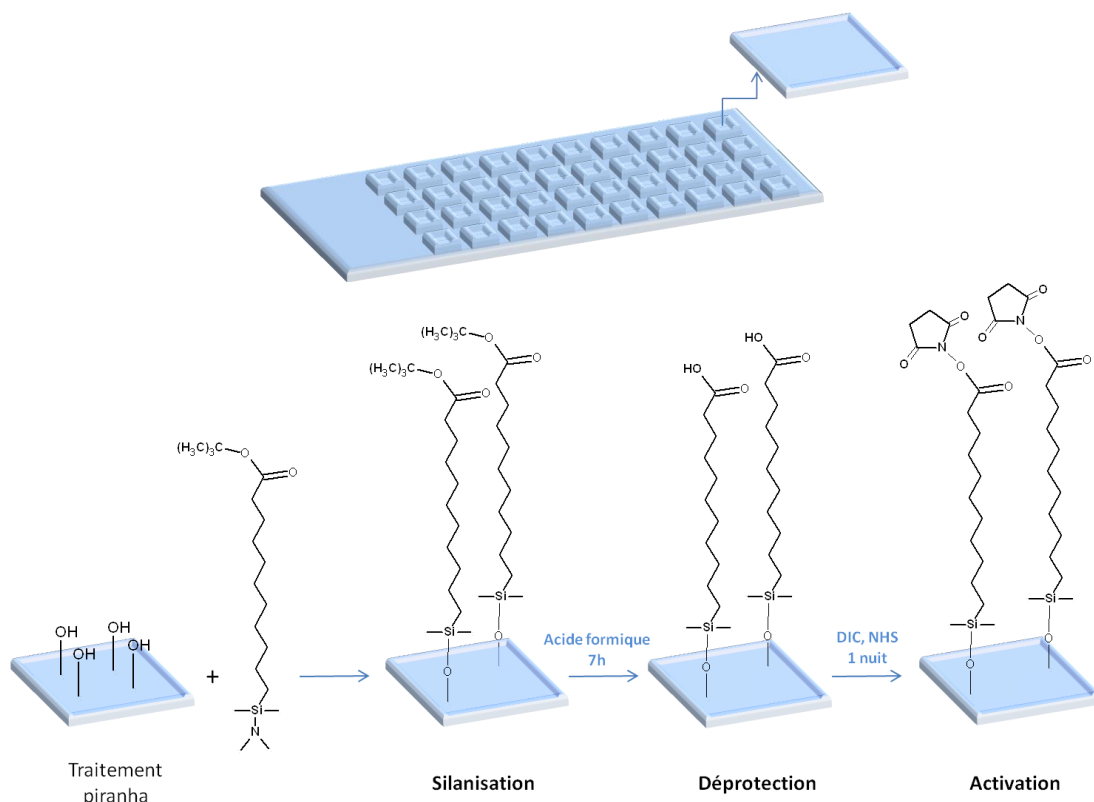


Figure 2-4 Schéma explicatif des différentes étapes lors de la silanisation, déprotection et activation des lames de verre.

DIC= di(isopropyl)carbodiimide et NHS= N-hydroxysuccinimide

2.2.4. Immobilisation du simple brin d'ADN

Toutes les séquences d'oligonucléotides (ODN*) modifiés $-NH_2$ (Tableau 2-3), utilisées dans cette thèse, ont été achetées chez Eurogentec et ont été choisies exclusivement pour la bonne fabrication de la plateforme d'ancrage (bonne spécificité, bons rendements d'hybridation, etc. cf *Chapitre 3 partie 3.1*).

- Pour la lame microstructurée à 52 puits, chaque micropuits circulaire est associé à une seule séquence d'ADN. Ainsi 1 μ L du Zip désiré (25 μ M, PBS_{10X}*, pH 8,5) est pipeté au fond de chaque puits.
- Pour la lame microstructurée à 40 puits, chaque micropuits carré est considéré comme une micropuce indépendante. Cela signifie que nous pouvons immobiliser différentes séquences d'ADN dans le même micropuits. Ainsi, à l'aide d'un spotter piezoélectrique SCIENION, 300 picolitres des Zip désirés (25 μ M, PBS_{10X}, pH 8,5) sont spottés. Un micropuits peut contenir 100 spots d'ODN.

Dans les deux cas de figure l'immobilisation des simples brins d'ADN se fait durant la nuit à t.a. sous saturation d'eau puis durant une demi-journée dans un environnement sec (*Figure 2-5*). Les lames sont lavées dans du SDS_{0,1%}* (SDS, Sigma Steinheim, Allemagne) pendant 30min à 70°C puis rincées à l'eau désionisée, séchées à la centrifugeuse avant d'effectuer leur « capping ».

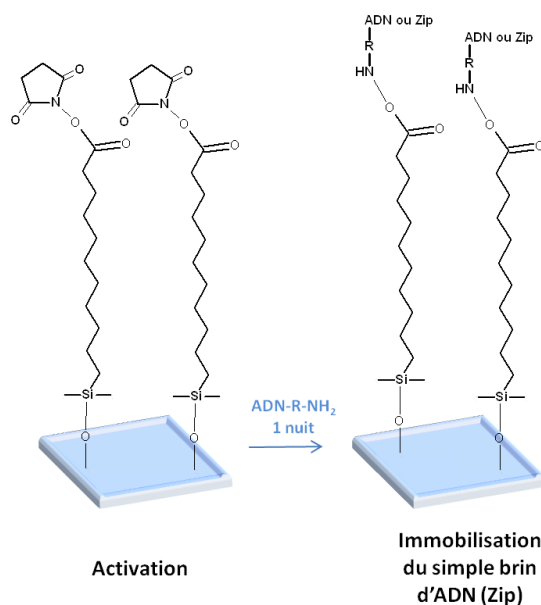


Figure 2-5 Schéma explicatif de l'immobilisation du simple brin d'ADN par liaison covalente à la surface du glycoarray

2.2.5. Capping des lames

Les lames sont plongées dans une solution de BSA_{4%}* pendant 2h à 37°C. Le lavage a été réalisé dans du PBS_{1X}-T_{0,05%} (3x3min), dans du PBS_{1X} (3x3min) (ROTH, Karlsruhe, Allemagne) puis dans de l'eau désionisée.

Cette étape de capping permet d'avoir un faible bruit de fond de la fluorescence afin d'augmenter la sensibilité de la détection. La BSA (sérum albumine de bovin), protéine considérée de forme ellipsoïdale et de dimension 140 × 40Å, est connue pour limiter les interactions non spécifiques de la cible sur la surface lors de la réaction d'hybridation (Schna 2002).

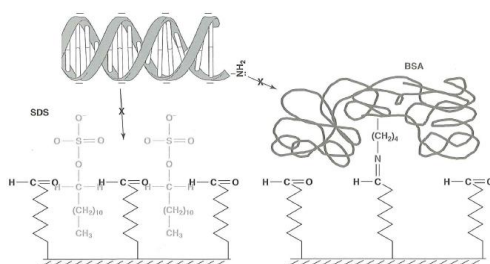


Figure 2-6 La BSA limite les interactions non spécifiques de la cible sur la puce (Schna 2002)

2.2.6. Immobilisation du glycoconjugué par hybridation de l'ADN (Immobilisation « sur puce »)

Pour l'approche « sur support », les glycoconjugués sont préalablement immobilisés à la surface du glycoarray par hybridation (Zhang et al. 2009a).

- Pour la lame microstructurée à 52 puits, chaque micropuits circulaire est fonctionnalisé avec une seule séquence ADN (Zip). Ainsi 1 μ L d'une solution contenant le glycoconjugué porté par le C_Zip correspondant (complémentaire de la séquence ADN immobilisé) (1 μ M, PBS_{1X}, pH 7,4) est pipeté au fond de chaque puits.
- Pour la lame microstructurée à 40 puits, chaque micropuits carré est fonctionnalisé avec plusieurs Zip. Ainsi 2,5 μ L d'une solution contenant les glycoconjugués porté par les C_Zip correspondants (1 μ M, PBS_{1X}, pH 7,4) est pipeté au fond de chaque puits.

Dans les deux cas, l'hybridation se fait durant 3h sous saturation d'eau à 37°C (Figure 2-7). Les lames sont ensuite lavées 1min dans du SSC_{2X} - 0.1% SDS à 51°C puis 5min dans du SSC_{2X} à t.a. et enfin rincées à l'eau désionisée. L'avantage de cette technique est de pouvoir contrôler l'hybridation par fluorescence en scannant la lame à 532nm (lecture de la fluorescence du 1^{er} fluorophore : Cy3), à un gain appliqué au photomultiplicateur (pmt*) de 380 ou 400.

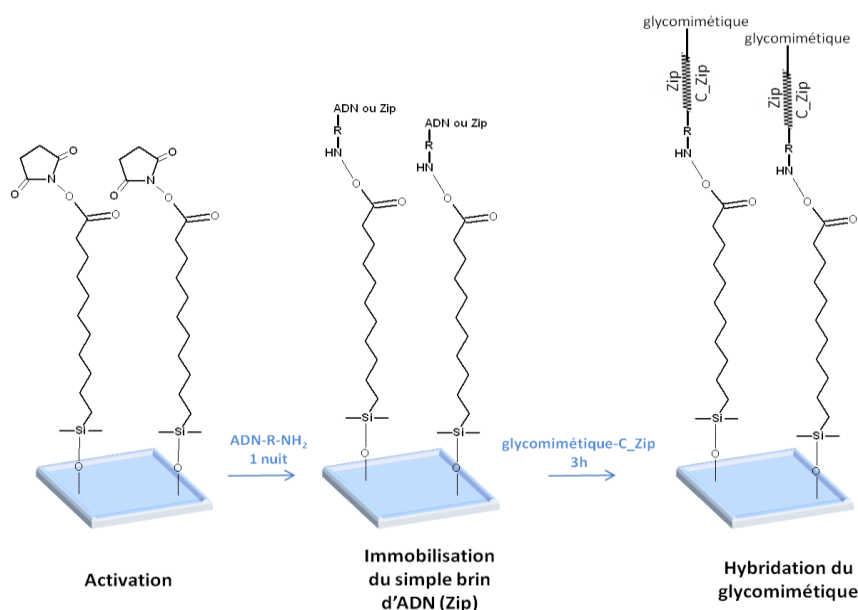


Figure 2-7 Schéma explicatif de l'immobilisation du glycocluster par hybridation d'ADN à la surface du glycoarray

2.2.7. Reconnaissance biologique des sucres par la lectine

2.2.7.1. Marquage des lectines

Les lectines sont marquées par le fluorophore Alexa647 en utilisant le kit Invitrogen : *Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling Kit (A30009)*. Kit contenant l'Alexa Fluor 647 acide carboxylique-succinimidyl ester ($MM = 3000 \text{ g.mol}^{-1}$), le bicarbonate de sodium, le tube de réaction, la colonne de centrifugation (Nanosep® MF 0.2µm) et la résine pour purifier (Bio-Gel® P-6 fine résine suspendue dans du PBS_{1X}).

Il faut décongeler lentement l'aliquot de 1mL de lectine à marquer en le plaçant la veille dans le réfrigérateur à 4°C puis déterminer la quantité de marqueur optimale pour effectuer le marquage :

$$\text{Volume d'Alexa}(\mu\text{l}) = \frac{\left[1000 \times \frac{m_{\text{protéine}}}{MM_{\text{protéine}}} \right] \times MR}{7.94}$$

Où $m_{\text{protéine}}$ est la masse de lectine à marquer (en µg), $MM_{\text{protéine}}$ est la masse molaire de la lectine à marquer (en Da), MR est le ratio molaire entre le fluorophore et la protéine déterminé dans la table d'information du kit de marquage.

- *Pseudomonas Aeruginosa* lectin I (PA-IL) et *Pseudomonas Aeruginosa* lectin II (PA-IIL) (Imberty et al. 2004), fournies par Dr. Anne IMBERTY, CERMAV, sont stockées à 1 mg.ml^{-1} à -25°C . On a $MM_{(\text{PA-IL})} = 51\text{kDa}$ et $MM_{(\text{PA-IIL})} = 47\text{kDa}$, $m_{\text{lectine}} = 100\mu\text{g}$ et d'après la table du fournisseur $MR_{\text{lectine}} = 12$. Il faut donc $3,0\mu\text{l}$ ou $3,2\mu\text{l}$ d'Alexa647 pour marquer respectivement $100\mu\text{g}$ de PA-IL ou de PA-IIL.
- *Pseudomonas Aeruginosa* lectin FliD (Imberty et al. 2004), fournies par Dr. Olivier VIDAL, UGSF à Lille, sont stockées à 23 mg.ml^{-1} à -80°C . On a $MM_{(\text{FliD})} = 47.5\text{kDa}$, $m_{\text{lectine}} = 100\mu\text{g}$ et d'après la table du fournisseur $MR_{\text{lectine}} = 12$. Il faut donc $3,0\mu\text{l}$ d'Alexa647 pour marquer respectivement $100\mu\text{g}$ de lectine FliD.
- *Burkholderia ambifaria* β-propeller lectin (BambL) (Audfray et al. 2012), fournies par Dr. Anne IMBERTY, CERMAV, est stockée à 1 mg.ml^{-1} à -25°C . On a $MM_{(\text{BambL})} = 30\text{kDa}$, $m_{\text{lectine}} = 67\mu\text{g}$ et d'après la table du fournisseur $MR_{\text{lectine}} = 11$. Il faut donc $3,0\mu\text{l}$ d'Alexa647 pour marquer $67\mu\text{g}$ de lectine BambL.

Dans le tube de réaction, par batch de 50µl, laisser réagir, pendant 15min, 50µl de lectine, 5µl de bicarbonate de sodium et la bonne quantité d'Alexa647. Puis filtrer sur résine fine et centrifuger pendant 1min à 16000 x g* afin d'éliminer le fluorophore n'ayant pas réagit. Enfin, en mesurant au spectrophotomètre SAFAS les absorbances à 280nm et 650nm, déterminer la concentration de lectine marquée ainsi que le degré de marquage par lectine (DOL).

2.2.7.2. « Sur puce » : solution de reconnaissance contenant la lectine

La solution de reconnaissance comporte la lectine marquée (PA-IL ou PA-IIL ou BambL à 0.12µM en concentration finale), CaCl₂ à 0,83µg.ml⁻¹ et BSA à 2%. On verse 1µl ou 2,3µl, en fonction du type de lame, de cette solution de reconnaissance dans chaque micropuits puis on laisse incuber 2h à 37°C sous saturation d'eau. Laver au PBS-T_{0.02%} pendant 5min à t.a. puis rapidement à l'eau désionisée avant de centrifuger (3min à 1500 rpm)

Figure 2-8.

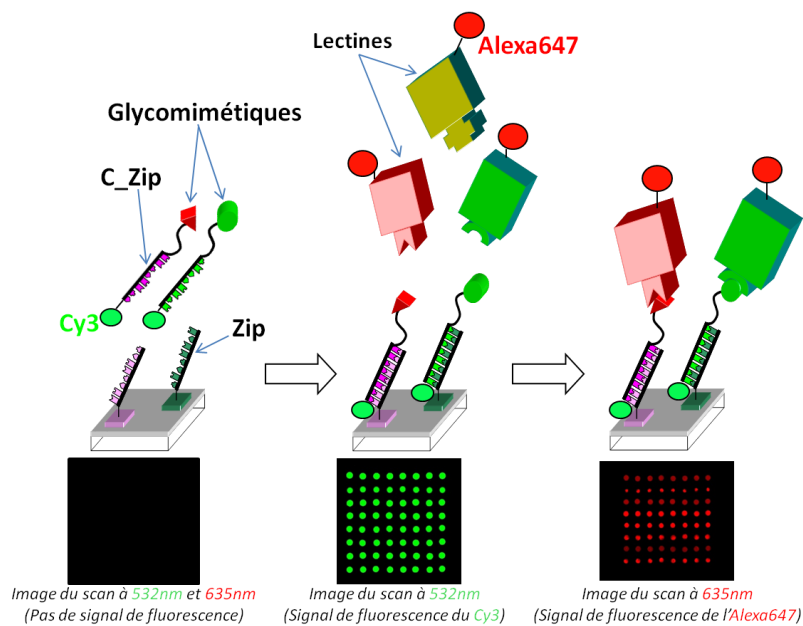


Figure 2-8 Schéma explicatif de la reconnaissance sucre/lectine « sur support ».

2.2.7.3. « En solution » : solution de reconnaissance contenant la lectine et les glycoclusters

La solution de reconnaissance comporte la lectine marquée à 0.12µM (PA-IL ou PA-IIL ou BambL), les glycoclusters en concentration finale à 1µM, CaCl₂ à 0,83µg.ml⁻¹ et BSA à 2%. On verse 1µl ou 2,3µl, en fonction du type de lame, de cette solution de reconnaissance dans chaque micropuits puis on laisse incuber 2h à 37°C sous saturation d'eau. Laver au PBS-

T_{0.02%} pendant 5min à t.a. puis rapidement à l'eau désionisée avant de centrifuger (3min à 1500 rpm) *Figure 2-9.*

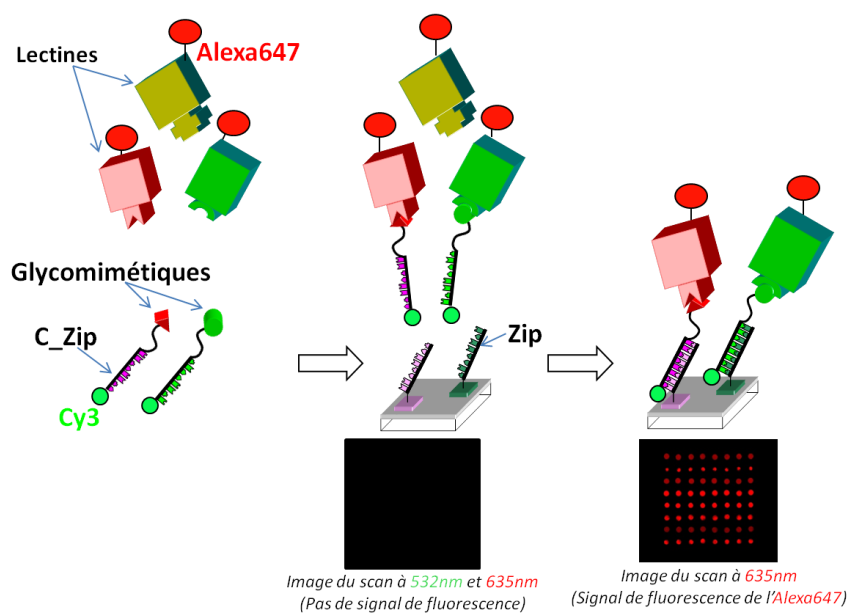


Figure 2-9 Schéma explicatif de la reconnaissance sucre/lectine « en solution ».

2.2.8. Recyclage des lames microstructurées

Par batch de 40 lames, sur la nuit, les lames sont placées dans un bain d'eau désionisée avec du détergent TDF₄ à 0.5% (Franklab SA, Billancourt, France). Après 3 lavages à l'eau désionisée le lendemain, nous nettoyons les lames avec une solution acide (piranha acide : H₂O₂/H₂SO₄ : 2/3) pendant 30min sous ultrasons puis les rinçons à l'eau désionisée (18,2 MΩ) jusqu'à atteindre un pH neutre avant de les sécher par centrifugation à 1300 rpm pendant 3min. Nous enchainons avec un nettoyage avec une solution basique (piranha basique : H₂O₂/NH₃/H₂O : 1/1/5) pendant 1h à 100°C. Nous les rinçons à l'eau désionisée (18,2 MΩ) jusqu'à atteindre un pH neutre avant de les sécher par centrifugation à 1300 rpm pendant 3min. A partir de ce moment nous reprenons le cycle à partir du 2.2.3.

2.3. Lecture de la fluorescence

Les lames microstructurées sont scannées avec le scanner pour biopuce, logiciel GenePix Pro 6.0 adapté pour le scanner GenePix 4100A (Axon Instruments, Sunnyvale, USA), aux longueurs d'onde d'excitation de 532 et 635nm (λ_{ex} 532/635 nm et λ_{em} 575/670 nm). A 532nm, lecture du fluorophore Cy3, on peut contrôler la bonne hybridation du glycocluster-Cy3 à la surface de la biopuce. A 635nm, lecture des fluorophores Cy5 ou Alexa647, on peut déterminer si la lectine-Alexa647 interagit avec le glycocluster-Cy3.

Fluorophore	Couleur	Couleur de fluorescence	λ_{Absorb} (nm)	λ_{Emi} (nm)	MM (g.mol ⁻¹)	QY (%)
Cy3	Rose	Vert	550	570	767	0.15
Cy5	Bleu	Rouge	649	670	792	0.28
Alexa Fluor647	Bleu	Rouge	650	665	1300	0.33

Tableau 2-4 Caractéristique des fluorophores utilisés (Berlier et al. 2003). MM=Masse molaire, Absorb=Absorption, Emi=Emission, QY=Rendement quantique de fluorescence = nombre de photons émis / nombre de photons absorbés

Les spots ont été définis comme étant circulaires, de diamètre 80 à 100 μm et distants de 150 à 200 μm l'un de l'autre. Chaque cercle d'analyse édité automatiquement a été réajusté manuellement pour encercler au mieux chaque spot de fluorescence expérimental.

Le signal de fluorescence de chaque spot a été déterminé comme étant la moyenne de la fluorescence de chaque pixel constituant le spot. Puis, pour chaque glycocluster, le signal de fluorescence a été déterminé par la moyenne des fluorescences obtenues pour chacun des 8 spots correspondant à ce glycocluster. Avec cette technique de spotting via le spotter piezo électrique, il y a une très bonne homogénéité d'hybridation intra Zip (c'est-à-dire entre huit spots identiques pour 1 séquence ADN à 25 μM , PBS10x, pH 8.4) mais surtout très bonne homogénéité d'hybridation inter Zip (c'est-à-dire entre 7 spots de séquences ADN différentes à 25 μM , PBS10x, pH 8.4). Si toutefois l'hybridation n'était pas homogène, les intensités de fluorescence à 635nm (du Cy5 ou de l'Alexa647) peuvent être corrigées en fonction de la normalisation du signal à 532nm (du Cy3).

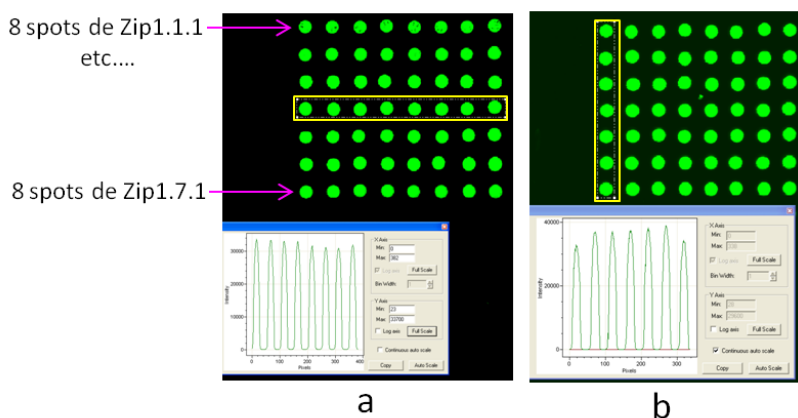


Figure 2-10 Photo du scan d'un puits à 532nm, montrant l'homogénéité d'hybridation (a) intra Zip et (b) inter Zip.

2.4. Utilisation du glycoarray pour la mesure de fluorescence directe (FI₆₃₅), des K_d ou des IC₅₀

Nous allons expliquer dans ce paragraphe comment effectuer une analyse qualitative (mesure des FI₆₃₅), semi-quantitative (mesure d'IC₅₀) ou bien quantitative (mesure de *K_d*) des complexes glycoclusters/lectines étudiés (Goudot et al. 2013).

2.4.1. Etapes communes du mode opératoire

Avant la présentation des trois méthodes de mesure d'interaction à l'aide des glycoarray (test qualitatif, semi-quantitatif et quantitatif), les premières étapes communes du mode opératoire sont listées ci-dessous. Ainsi, pour chaque expérience, les lames de verre borosilicatées (microstructurées avec 40 puits) ont été déprotégées sous conditions acides puis ester activées avec du NHS après silanisation selon le protocole ci-dessus partie 2.2.3. La suite des expériences a été divisée en trois étapes avec la méthode « en solution »:

1) Immobilisation par exemple de 7 simples brins d'ADN (Zip1.*i* avec *i*= [1-7], à 25μM dans le PBS_{10x}, pH 8.5) au fond de chaque puits à l'aide du spotter. Chaque séquence Zip est spottée 8 fois, ainsi nous avons 7 lignes de 8 spots identiques (56 spots par puits, *Figure 2-11*) afin d'étudier la répétabilité des mesures. Puis lavage des lames pour enlever l'excès de Zip non immobilisé par liaison covalente.

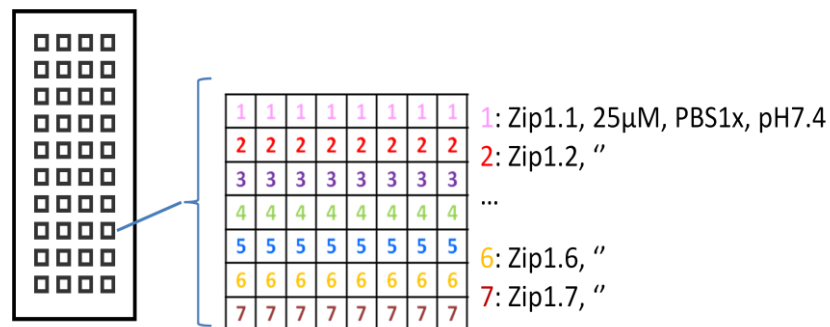


Figure 2-11 Schéma du plan de spotting de la lame

2) Capping des lames dans une solution de BSA_{4%} afin de limiter les adsorptions non spécifiques, sur la surface des lames, des glycoclusters et lectines étudiés.

3) La troisième étape varie en fonction des tests d'affinité réalisés. Il s'agit de l'incubation des solutions comportant les complexes glycoclusters /lectine formés en solution avec, en fonction du test, variation des concentrations en lectine ou variation des concentrations en inhibiteur utilisé. Les détails sont expliqués ci-dessous parties 2.4.2 à 2.4.4.

2.4.2. Analyse qualitative : FI_{635}

La mesure de fluorescence à 635nm du glycoarray permet de réaliser une analyse qualitative de l'interaction glycocluster/lectine (Figure 2-12). En effet, que ce soit la méthode « sur support » ou « en solution » expliquées précédemment, en traçant $FI_{635} = f(\text{glycocluster})$, on détecte si la lectine interagit plus ou moins avec les glycoclusters immobilisés à la surface du glycoarray. Ainsi, plus la FI_{635} est élevée, plus l'affinité du glycocluster avec la lectine est élevée. La comparaison des intensités de fluorescence nous permet de conclure qualitativement quant aux glycoclusters les plus affins vis-à-vis de la lectine.

Incuber, pendant 3h à 37°C sous saturation d'eau, 2 μ l de solution contenant : glycoclusters ($[\text{glycoclusters}]_f = 1\mu\text{M}$), lectine ($[\text{lectine}]_f = 0.12\mu\text{M}$), BSA ($[\text{BSA}]_f = 2\%$), CaCl_2 ($[\text{CaCl}_2]_f = 1\mu\text{g.ml}^{-1}$) dilués dans du PBS_{1X} (pH=7.4). Laver 5min dans du PBS-Tween_{0.02%} à 4°C puis rapidement à l'eau désionisée (18,2M Ω) avant de sécher par centrifugation (3min à 1500 rpm). Lire les fluorescences au scanner à 532nm (pmt 380) et 635nm (pmt 500).

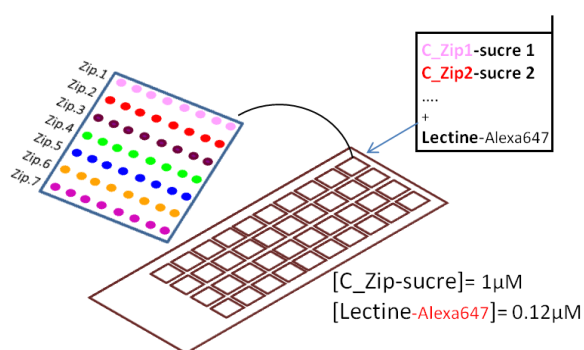


Figure 2-12 Schéma explicatif de l'analyse qualitative (FI_{635}) méthode « en solution »

2.4.3. Analyse semi-quantitative : IC_{50}

La mesure d' IC_{50} permet de réaliser une analyse semi-quantitative de l'interaction glycocluster/lectine (Figure 2-13). En effet, que ce soit la méthode « sur support » ou « en solution » (expliquées précédemment), en traçant $FI_{635} = f\{\log[\text{inhibiteur}]\}$, on détermine la concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% du signal à 635nm. Ainsi, plus l' IC_{50} est élevé, plus l'affinité du glycocluster avec la lectine est élevée. La comparaison des IC_{50} nous permet de conclure semi-quantitativement quant aux glycoclusters les plus affins vis-à-vis de la lectine.

La solution d'incubation contient : glycoclusters ($[\text{glycoclusters}]_f = 1\mu\text{M}$), lectine ($[\text{lectine}]_f = 0.12\mu\text{M}$), BSA ($[\text{BSA}]_f = 2\%$), CaCl_2 ($[\text{CaCl}_2]_f = 1\mu\text{g.ml}^{-1}$) dilués dans du PBS_{1X} (pH=7.4). Dans chacun des 20 petits tubes, ajouter l'inhibiteur pour avoir les concentrations

finales désirées (Tableau 2-5). Verser 2µl de chaque solution dans les 20 microréacteurs correspondant et laisser incuber à 37°C pendant 3h sous saturation d'eau. Laver 5min dans du PBS-Tween_{0,02%} à 4°C puis rapidement à l'eau désionisée (18,2MΩ) avant de sécher par centrifugation (3min à 1500 rpm). Lire les fluorescences au scanner à 532nm (pmt 380) et 635nm (pmt 500).

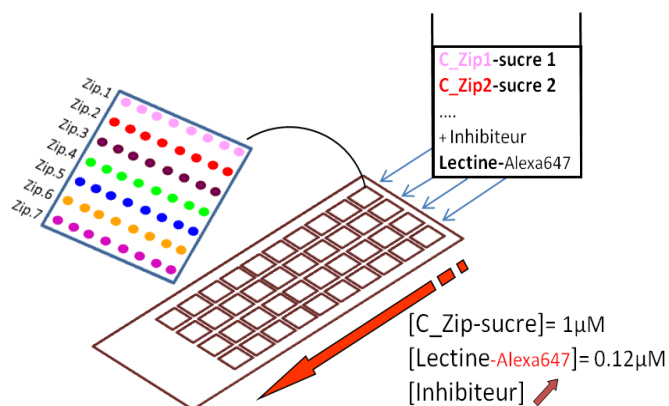


Figure 2-13 Schéma explicatif de l'analyse semi-quantitative (IC_{50}). Adapté de (Goudot et al. 2013)

Microréacteur	[Inhibiteur] _{finale} (µM)
1	0
2	0,00001
3	0,0001
4	0,001
5	0,005
6	0,01
7	0,05
8	0,1
9	1
10	5
11	10
12	50
13	100
14	500
15	1000
16	5000
17	10000
18	50000
19	100000
20	300000

Tableau 2-5 Gradient de concentration en inhibiteur

Les valeurs d' IC_{50} sont déterminées en utilisant le logiciel « BioDataFit 1.02 » avec son modèle « Sigmoidal » :

$$Y = a + (b - a) / [1 + 10^{(x - c)}]$$

où $a = FI_{min}$, $b = FI_{max}$, $x = \log[Inhibiteur]$ et $c = \log(IC_{50})$. FI_{min} / max est le minimum / maximum de signal de fluorescence Alexa-647 observé pour un glycocluster.

On obtient des courbes d'IC₅₀ pour chaque glycocluster de la forme de la *Figure 2-14* en traçant $FI_{635} = f \{ \log [\text{inhibiteur}] \}$.

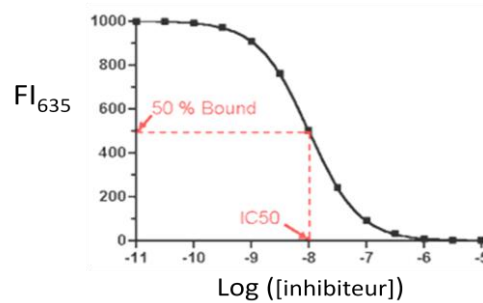


Figure 2-14 Représentation de courbes d'IC₅₀.

2.4.4. Analyse quantitative : K_d

La mesure de K_d permet de réaliser une analyse quantitative de l'interaction glycocluster/lectine (*Figure 2-15*). En effet, que ce soit la méthode « sur support » ou « en solution » (expliquées précédemment), en traçant $FI_{635} = f \{ [lectine] \}$, on détermine par régression linéaire, le coefficient de dissociation du complexe glycocluster/lectine. Ainsi, plus le K_d est faible, plus l'affinité du glycocluster avec la lectine est élevée. La comparaison des K_d nous permet de conclure quantitativement quant aux glycoclusters les plus affins vis-à-vis de la lectine.

La solution d'incubation contient : glycoclusters ($[glycoclusters]_f = 1\mu M$), BSA ($[BSA]_f = 2\%$), $CaCl_2$ ($[CaCl_2]_f = 1\mu g.ml^{-1}$) dilué dans du PBS_{1X} (pH=7.4). Dans chacun des 20 petits tubes, ajouter la lectine pour avoir les concentrations finales désirées (*Tableau 2-6*). Verser 2 μl de chaque solution dans les 20 microréacteurs correspondant et laisser incuber à 37°C pendant 3h sous saturation d'eau. Laver 5min dans du PBS-Tween_{0,02%} à 4°C puis rapidement à l'eau désionisée (18,2M Ω) avant de sécher par centrifugation (3min à 1500rpm). Lire les fluorescences au scanner à 532nm (pmt 380) et 635nm (pmt 500).

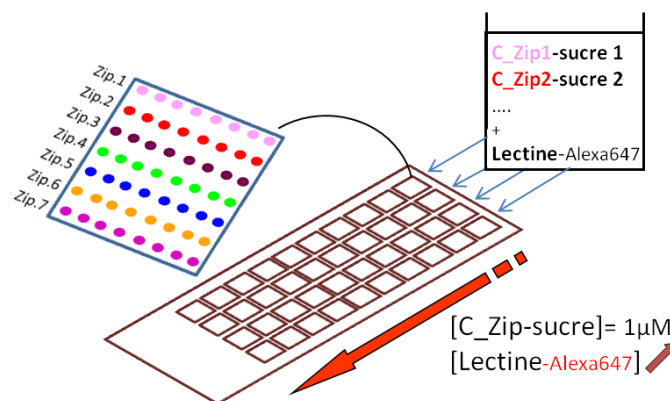


Figure 2-15 Schéma explicatif de l'analyse quantitative (K_d). Adapté de (Goudot et al. 2013)

Microréacteur	[Lectine] (nM)
1	1
2	10
3	50
4	80
5	100
6	150
7	200
8	300
9	400
10	500
11	600
12	800
13	1000
14	1200
15	1400
16	1600
17	1800
18	2000
19	2200
20	2400

Tableau 2-6 Gradient de concentration en lectine

On obtient des isothermes de Langmuir pour chaque glycocluster de la forme de la *Figure 2-16* en traçant $FI_{635} = f \{ [lectine] \}$.

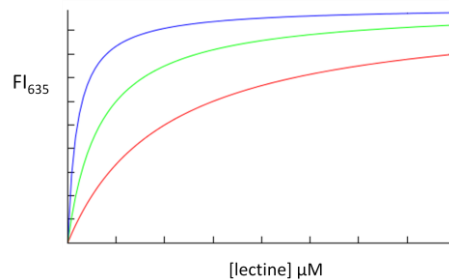


Figure 2-16 Représentation d'isothermes de Langmuir

Les valeurs de Kd sont déterminées par la lecture de l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire, tracées suivant la formule ci-dessous :

$$\frac{[Lectine]}{FI} \equiv \frac{1}{FI_{max}} \times [Lectine] + \frac{Kd}{FI_{max}}$$

Équation 2-1 Equation de détermination de la constante de dissociation Kd pour l'étude des interactions lectine/sucre sur une surface

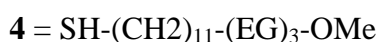
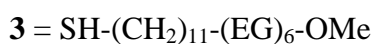
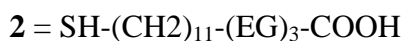
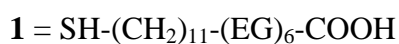
où FI correspond au signal de fluorescence observé pour un glycocluster à une concentration en lectine donnée. FI_{max} correspond au maximum de fluorescence observé pour ce glycocluster étudié. Et enfin, $[Lectine]$ est la concentration en lectine marquée.

2.5. Etude sur biopuce avec une surface d'or

2.5.1. Matériel utilisé

Les lames d'or sont des lames Schott industrielles D263T, de dimension 25x75mmx1mm, polies et traitées selon les spécifications suivantes : couche de chrome puis d'or respectivement d'épaisseur 1,5nm et 53nm. Elles sont découpées en 8 morceaux (environs 10 échantillons de 2mm par 2mm) grâce à une pointe en diamant.

Quatre molécules de thiols ont été testées pour réaliser l'étude de fonctionnalisation de surface sur couche d'or (*Figure 2-17*) :



Les thiols **1** et **2** ont été choisis pour réaliser les monocouches auto-assemblées (SAM). Les thiols **3** et **4** ont été choisis pour limiter les interactions non spécifiques possibles dans les SAM mixtes. C'est un système « antifouling », anti-incrustations sur la surface de la lame fonctionnalisée avec l'or.

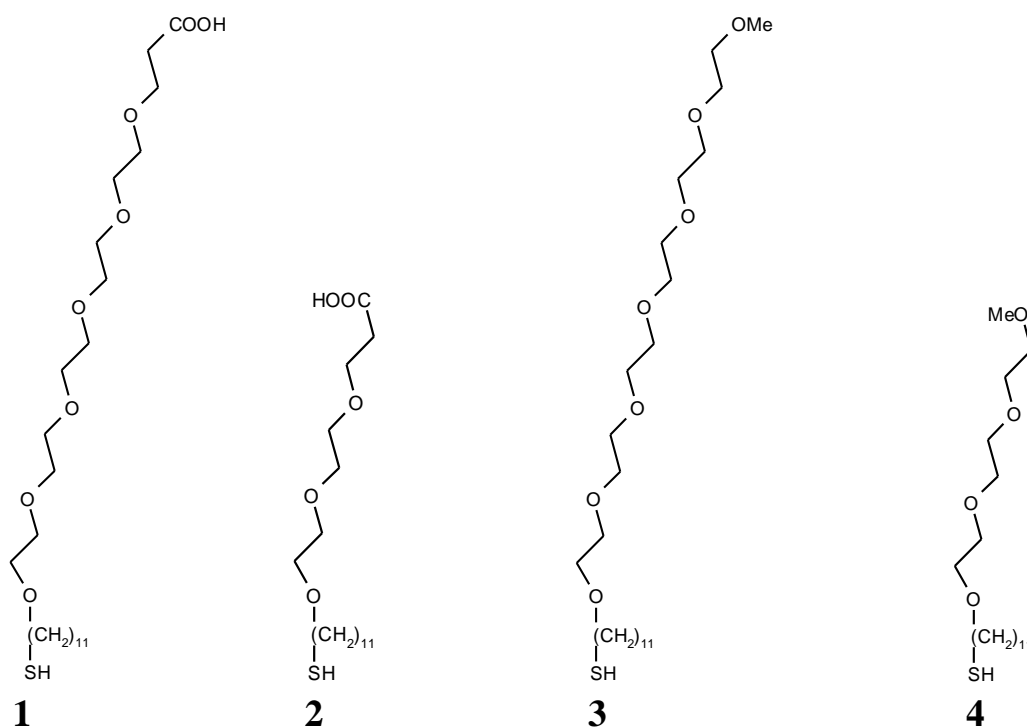


Figure 2-17 Représentation des thiols étudiés

2.5.1. Prétraitements

Avant toute fonctionnalisation les échantillons (lame de verre recouverte d'une couche d'or) doivent être nettoyés. Différents traitements ont été réalisés.

2.5.1.1. *Piranha*

La verrerie est lavée au savon puis rincée 4 fois à l'eau désionisée puis séchée. Préparer un piranha ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$: 2/3) frais puis attendre la fin de l'effervescence afin de ne pas décrocher la couche d'or de la lame. Les différents échantillons sont plongés dans cette solution de piranha pendant 3 minutes puis rincés à l'eau ultra pure avant d'être séchés sous un flux d'azote.

2.5.1.2. *Plasma O_2*

En salle blanche, introduire les échantillons dans un réacteur à plasma (modèle Anatech Plasma Line) puis les laisser 10 minutes sous plasma oxygène.

2.5.1.3. *Ozone O_3*

Préchauffer la lampe UV 30 minutes puis laisser 30 minutes les échantillons sous les radiations.

2.5.2. Formation des monocouches auto-assemblées (SAM)

Immersion du substrat dans une solution fraîchement préparée de mélange de thiols (molécules **1** à **4**) à 10mM dans l'éthanol absolu pendant 3h. Rinçage des échantillons à l'éthanol puis séchage sous flux d'azote (Briand et al. 2006). Ci-dessous (*Figure 2-18*) ont été représentés les différentes SAM réalisées : des SAM simples avec le thiol 2 ou le thiol 4 puis une SAM mixte avec les thiols 2 et 4.

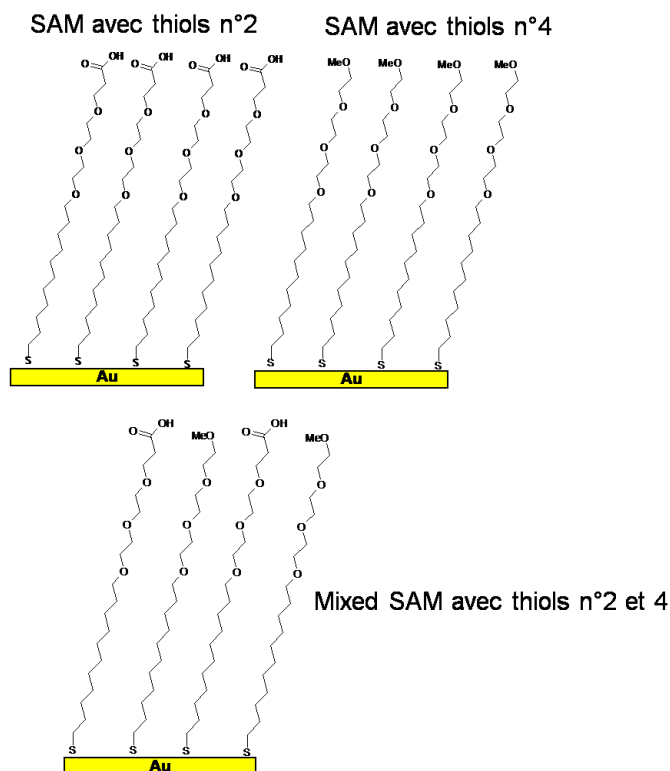


Figure 2-18 Représentation des SAM simples et mixtes réalisées

2.5.3. Activation de la surface

On active la surface traitée avec une solution de NHS (20mM) et EDCI (10mM) dans l'eau pendant 2h (Figure 2-19) (Briand et al. 2006).

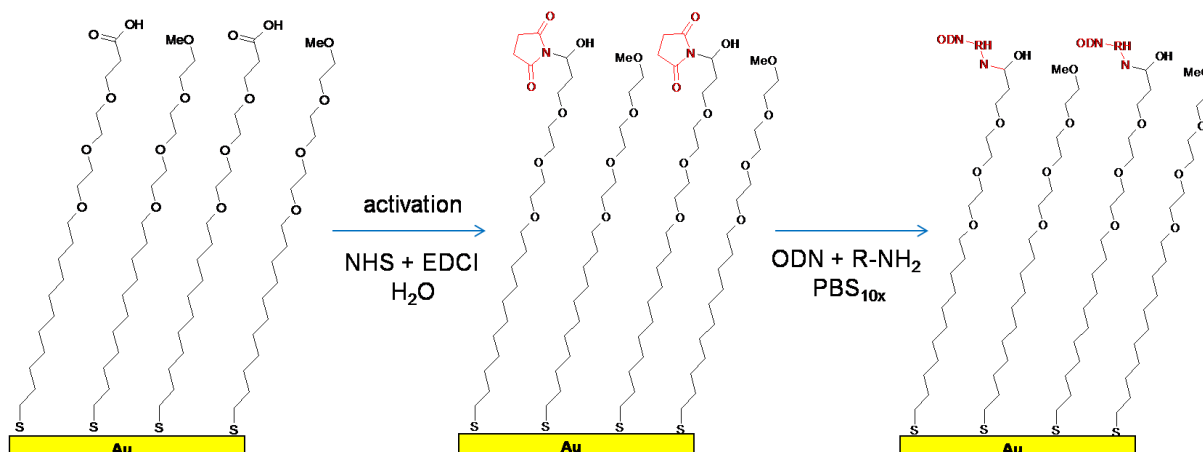


Figure 2-19 Représentation de l'activation de la SAM simple de thiols 2 et 4

2.5.4. Caractérisation de la surface

2.5.4.1. XPS

Les surfaces ont été caractérisées avant et après traitement et fonctionnalisation à l'aide d'un spectromètre de type V.S.W (ESCA 150), équipé de deux sources standard AlK α .

monochromatisée et MgK α (respectivement à 1486.6 eV et 1253.6 eV). L'utilisation d'un monochromateur permet d'éliminer les raies satellites et de minimiser la largeur de la raie X principale.

Scan général des échantillons:

Bornes d'analyses : [1000,00000 à -10,00000] eV
Pas = -1.25000

Scan sur O1s:

Bornes d'analyses : [560.00000 à 535.00000] eV
Pas = -0.02500

Scan sur Au4f:

Bornes d'analyses : [97.00000 à 77.00000] eV
Pas = -0.0500

Scan sur C1s:

Bornes d'analyses : [290.00000 à 281.00000] eV
Pas = -0.05000

Scan sur N1s:

Bornes d'analyses : [408.00000 à 388.00000] eV
Pas = -0.02500

Scan sur P2p:

Bornes d'analyses : [144.00000 à 124.00000] eV
Pas = -0.0250

Scan sur S2p:

Bornes d'analyses : [173.00000 à 153.00000] eV
Pas = -0.02500

2.5.4.2. *DDX*

Les surfaces ont été caractérisées avant et après traitement et fonctionnalisation à l'aide d'un diffractomètre Bragg-Brentano (θ/θ) de marque Rigaku équipé d'un tube à rayons X possédant un monochromateur Ge x 2 (2.2.0) afin d'avoir un faisceau monochromatique. Le logiciel adapté est SmartLab Guidance.

a) Paramètres pour mesure de réflectivité

Vitesse de scan = 0.4°/min

Angle θ = de 0° à 6°

Pas = $4 \cdot 10^{-3}$

Largeur de la fente d'entrée = 0.05 mm puis 5 mm

Réception « soller slit » = 5°

Série de 3 fentes : 0.050 mm, 0.150 mm, 0.150 mm

b) Mesure en incidence rasante

Pour mesurer la distance entre les thiols il ne faut faire une mesure en faisceau à incidence rasante ($\theta < \theta_{critique}$). Il n'y a pas de réflexion mais le faisceau reste en surface et crée une onde évanescente. On fait tourner le détecteur ($\varphi = 5^\circ$ à 10°) et on cherche l'angle où il y a un

pic signifiant qu'il y a diffraction dans les conditions de Braggs grâce à la périodicité des SAM. Dans ce cas ni on a $\theta=0.3^\circ$.

2.5.4.3. Angle de contact

Les surfaces ont été caractérisées avant et après traitement et fonctionnalisation à l'aide d'un instrument optique de type GBX Instrumentation Scientifique. Plusieurs paramètres doivent être contrôlés avant de commencer les expériences comme : l'éclairage, le contraste, la netteté de l'image, l'agrandissement et le volume de la goutte. Puis des gouttes de solvant (eau, éthylène glycol, diiodométhane) d'environ 0.80 μL ont été déposées sur la surface des échantillons. Le contour de la goutte peut être décrit mathématiquement et l'angle de contact est donné à partir de la tangente au point triple solide - liquide - vapeur.

L'utilisation de trois solvants a eu pour but de déterminer les énergies de surface totales, les composantes polaires et dispersives des différentes surfaces des échantillons grâce à l'utilisation du modèle d'Owens Wendt : $\gamma_l [1+\cos(\theta)] = 2 \gamma_{ld}$, avec γ_l et γ_{ld} respectivement les énergies de surface liquide-air et de l'interface solide-liquide. Ce modèle permet de caractériser l'énergie de surface mais également la polarité d'une surface. Dans ce modèle, les énergies de surface des liquides et du solide ont été séparées en deux composantes : l'une dite polaire γ_p et l'autre dispersive γ_d , avec respectivement pour la phase liquide et solide une énergie de surface totale : $\gamma_l = \gamma_{ld} + \gamma_{lp}$ et $\gamma_s = \gamma_{sd} + \gamma_{sp}$.

2.5.4.4. Ellipsométrie

Les surfaces ont été caractérisées avant et après traitement et fonctionnalisation à l'aide d'un ellipsomètre JOBIN YVON possédant une lampe à arc permettant d'obtenir une large gamme de longueur d'onde (lumière blanche). Différents paramètres ont été choisis:

TEM : CA=0.7

TEM : CM=-0.6

λ = de 240nm à 720nm

Pas = 5 mm

Modulateur et Analyseur calibrés à 47°

Les résultats ont été obtenus sous forme de graphique. Les deux angles ellipsométriques ψ et Δ (en $^\circ$) en fonction de l'énergie des photons (en eV). L'angle Δ correspond à la différence des déphasages après les réflexions p et s de la lumière : $\Delta = \delta_p$ et δ_s . L'angle ψ est défini par la relation $\tan(\psi)$ qui est le rapport des modules des coefficients de réflexion p et s, $\tan(\psi) = r_p / r_s$.

Chapitre 3

Mise en place et évaluation de différentes méthodologies pour la mesure d'interactions

Dans ce troisième chapitre nous décrivons les différentes étapes de la mise en place et du développement du système d'analyse des interactions glycocluster/lectine utilisé lors de cette thèse : *la puce à glycoclusters* ou *glycoarray*. Nous présentons également le développement des différentes méthodologies (qualitative, semi-quantitative et quantitative) de mesures d'interactions réalisées à l'aide de cet outil analytique.

3.1. Validation de l'outil « glycoarray » : Choix des séquences ADN

Comme déjà vu dans le chapitre 1, l'immobilisation des glycoclusters sur la biopuce est une étape déterminante pour la réalisation d'un glycoarray. La méthode d'immobilisation doit garantir une bonne disponibilité et une bonne orientation de la sonde (glycocluster) vis-à-vis de la cible (lectine) ainsi qu'une distance suffisante vis-à-vis de la surface. De plus, elle doit préserver la structure tridimensionnelle de la sonde et de la cible. Elle doit également être reproductible et le rendement d'immobilisation doit idéalement être similaire entre les différentes sondes. Ainsi, il est important de bien choisir les séquences ADN afin de respecter ces conditions.

Dans ce paragraphe, nous décrivons la démarche quant au choix d'un ensemble de séquences ADN adéquates pour la mise en œuvre d'un glycoarray utilisé pour la détermination d'interactions multiplexées. En effet, il s'agit de choisir des séquences ADN (nommées Zip et C_Zip étant respectivement le simple brin d'ADN immobilisé sur la puce et son complémentaire en solution) capables de s'hybrider spécifiquement et sélectivement entre elles :

- Dans les mêmes conditions expérimentales
- Avec des taux d'hybridation similaires

- Spécifiquement et uniquement avec les complémentaires (sans cross-hybridation)

Ces paramètres ont été évalués in-silico en calculant:

- Pour le rendement d'hybridation : l'enthalpie libre d'hybridation avec son brin complémentaire immobilisé (modèle du plus proche voisin)
- Pour la cross-hybridation : l'enthalpie libre d'hybridation avec tous les autres brins immobilisés sauf le complémentaire.

Quatorze brins ont été sélectionnés in silico car ils présentaient des longueurs de brin comparables (18, 22 ou 25 mers), leurs T_m sont du même ordre de grandeur, et leurs %GC sont suffisamment élevés (*Tableau 3-1*). En effet, plus le %GC est élevé, plus il y a de triples liaisons hydrogène dans l'ensemble des séquences pour stabiliser le double brin hybridé. Ces séquences ont été testées expérimentalement sur biopuce. La détermination des différentes séquences ADN spécifiques et sélectives constitue l'étape *sine qua non* du développement technologique des glycoarrays exploitant la méthode DDI.

Référence	Séquence ADN 5'→3'	% GC	T_m
Zip 1.1	5'-GTG AGC CCA GAG GCA GGG-(CH ₂) ₇ -NH ₂	72,0	58.3
Zip 1.2	5'-GCT AAT CCA ACG CGG GCC AAT CCT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	56.3
Zip 1.3	5'-GTG GAG GCA CCA AGC TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	58.6
Zip 1.4	5'-CCA AGC GAG GTG GCA TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	59.6
Zip 1.5	5'-CCA GCA GTG GAG AGC TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	57.5
Zip 1.6	5'-GCA GAG AGC GTG CCA TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	59.7
Zip 1.7	5'-TTC TGT TCT CAG TTT TCC TTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	32,0	55.1
Zip 1.8	5'-AGT GGA GGT CAA CGA GCA ATT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	45,0	62.2
Zip 1.9	5'-AGG AGG AAC GCT CTA TCG CTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	50,0	62.4
Zip 1.10	5'-TGT GGA CTT GGT TTC TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	39,0	50.6
Zip 1.11	5'-ATA AGT ATT GGA CAA CTT GTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	27,0	50.5
Zip 1.12	5'-GTG AAC GTT TCC TCG TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	44,0	52.5
Zip 1.13	5'-ACA GTT GTT GGC GGT TGC TTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	45,0	53.9
Zip 1.14	5'-AAA ATA TCA TCT TTG GTG TTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	23,0	51.0

Tableau 3-1 Caractéristique des séquences ADN choisies pour l'étude. %GC et T_m calculés à partir du DNAMelt Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-melting>) avec $[Na^+]=137mM$ dans PBS_{1X}, $[C_Zip]=1\mu M$ et $T=37^\circ C$.

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta H + R \ln\left(\frac{[C_Zip]}{2}\right)} \times 1000$$

avec $[Na^+]=137mM$ dans PBS_{1X}, $[C_Zip]=1\mu M$ et $T=37^\circ C$.

Ces séquences ont été testées expérimentalement sur biopuce. La détermination des différentes séquences ADN spécifiques et sélectives constitue l'étape *sine qua non* du développement technologique des glycoarrays exploitant la méthode DDI. En effet, chaque

séquence d'ADN immobilisée doit être « l'adresse » d'un seul type de glycocluster sur la puce. S'il y a cross-hybridation entre les séquences, il ne sera pas possible dans l'étape suivante d'attribuer l'intensité de fluorescence à un glycocluster donné.

3.1.1. Test de cross-hybridation et d'hybridation de glycocluster

3.1.1.1. *Cross-hybridation*

Expérimentalement, nous procédons à un test de cross-hybridation entre les 14 séquences ADN sélectionnées in silico. Il s'agit de spotter les 14 simples brins d'ADN (Zip1.1 à Zip1.14 à 25 μ M, PBS_{10x}) au fond de chacun des 40 puits de la lame microstructurée puis de réaliser 40 expériences d'hybridation indépendantes (*Figure 3-1b*). Les complémentaires ont été marqués par le fluorophore Cy3 et nommés comme suit : C_Zip1.1-Cy3 à C_Zip1.14-Cy3. Ils sont incubés dans les différents puits à différentes concentrations (1 μ M, 0.1 μ M et 0.001 μ M, PBS_{1x}) afin de procéder à l'étape d'hybridation.

Plus précisément, représenté *Figure 3-1a*, dans les trois puits notés **1** une solution contenant seulement la séquence C_Zip1.1-Cy3 est incubée aux trois concentrations, dans les trois puits notés **2**, une solution contenant seulement la séquence C-Zip1.2-Cy3 est incubée aux trois concentrations, etc. Après 3h d'incubation à 37°C, dans les trois puits notés **1**, nous devrions observer de la fluorescence seulement pour les 4 premiers spots de la première ligne correspondant à la séquence ADN complémentaire. De même, dans les trois puits notés **2**, nous devrions observer de la fluorescence seulement pour les 4 derniers spots de la première ligne, dans les trois puits notés **12**, nous devrions observer de la fluorescence seulement pour les 8 spots de la septième ligne, etc.

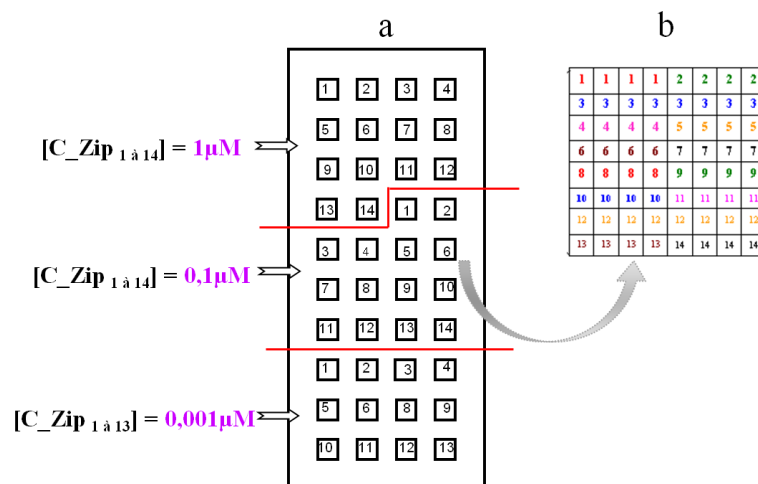


Figure 3-1 Représentation du plan de la lame pour le test de cross-hybridation. Chaque numéro correspondant au puits d'incubation du complémentaires C_Zip-Cy3, à la concentration désirée : 0.001, 0.1 ou 1µM (a) et Zoom sur un puits de la lame. Chaque numéro correspondant à la séquence ADN spottée (b).

La lecture de fluorescence au scanner à 532nm nous permet de contrôler la bonne spécificité et sélectivité des 14 séquences ADN choisies. On remarque Figure 3-2 que tous les C-Zip1.i (i = [1-14]) s'hybrident bien spécifiquement avec leur Zip1.i immobilisés à l'exception de trois séquences : C_Zip1.7, C_Zip1.12 et C_Zip1.14 qui cross-hybrident avec d'autres séquences.

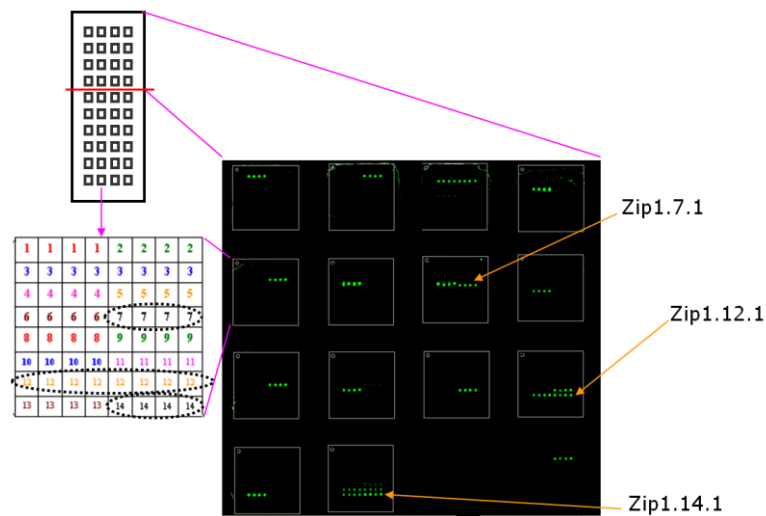


Figure 3-2 Représentation de la lame microstructurée avec le zoom d'un puits avec les numéros des séquences Zip spottées à 25µM (à gauche). Photo du scan de fluorescence à 532nm des 14 puits correspondants à [C_Zip1 à 14-Cy3]=1µM (à droite)

Le taux de cross-hybridation correspond au ratio du plus haut signal de fluorescence Cy3 observé pour C-Zip1.i sur celui d'un ADN immobilisé non complémentaire (Zip1.i' avec i'≠i) Figure 3-3. La limite tolérable de cross hybridation a été fixée à 10%. On peut noter que ce taux n'excède pas 10% pour toutes les séquences sauf les trois citées ci dessus.

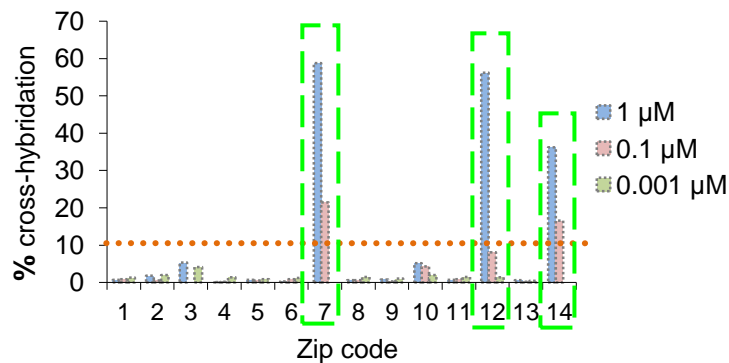


Figure 3-3 Représentation du taux de cross-hybridation en fonction des différentes séquences ADN (notées 1 à 14) pour trois concentrations en séquence complémentaire dans les solutions d'incubation ([Cy3-C_Zip1.i]= 1µM, 0.1µM ou 0.001µM avec i=[1-14])

La séquence Zip1.7 cross-hybride avec la séquence Zip1.6 (taux de cross-hybridation = 59%), la séquence Zip1.12 cross-hybride avec la séquence Zip1.11 (taux de cross-hybridation = 56%) et enfin la séquence Zip1.14 cross-hybride avec les séquences Zip1.12 (taux de cross-hybridation = 36%) et Zip1.13 (taux de cross-hybridation = 28%).

3.1.1.2. Hybridation de glycoclusters

Nous avons voulu ensuite évaluer l'influence de la structure du glycocluster, à savoir sa taille et sa charge, sur les rendements d'hybridation des zips codes. Pour ce faire nous avons étudié les rendements d'hybridation de glycoclusters ayant la même séquence Zip1.1 mais comportant de 2 à 10 résidus galactoses ou de 2 à 10 résidus fucoses. Le *Tableau 3-2* résume les caractéristiques des galactoclusters et fucoclusters évalués.

Glycoclusters	Valence	Zip code	Géométrie
1-(Man)₃	0	Zip 1.1	Linéaire en peigne (DMCH)
Gal₂ ou (DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₂	2	Zip 1.1	Linéaire en peigne (DMCH)
Gal₄ ou Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	Zip 1.1	Centré cœur hexose
Gal₈ ou Man[(proTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	8	Zip 1.1	Centré cœur hexose
Gal₁₀ ou Mannitol[Thme(MTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₅	10	Zip 1.1	Linéaire antenné (Mannitol)
Fuc₂ ou (DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₂	2	Zip 1.1	Linéaire en peigne (DMCH)
Fuc₄ ou Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	Zip 1.1	Centré cœur hexose
Fuc₈ ou Man[(proTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₄	8	Zip 1.1	Centré cœur hexose
Fuc₁₀ ou Mannitol[Thme(MTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₅	10	Zip 1.1	Linéaire antenné (Mannitol)

Tableau 3-2 Caractéristiques des glycoclusters étudiés : valence, zip code associé et leur géométrie.

Nous contrôlons sur les *Figure 3-4* et *Figure 3-5* que les rendements d'hybridation ne sont pas affectés par la taille ni la nature du glycocluster (de 2 à 10 résidus galactose ou fucose).

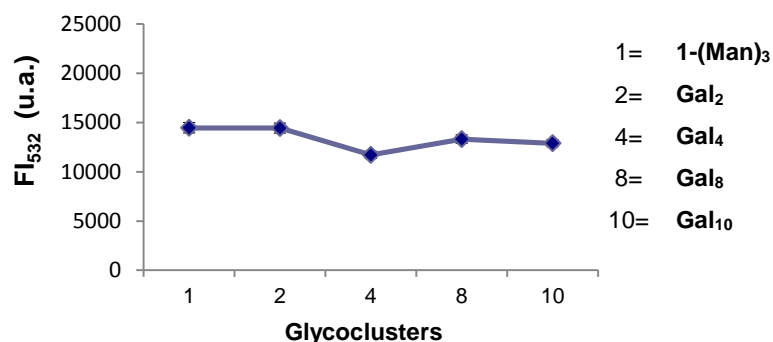


Figure 3-4 Moyenne des intensités de fluorescence du Cy3 à 532nm (u.a.) en fonction du nombre de galactose. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 64 répétitions

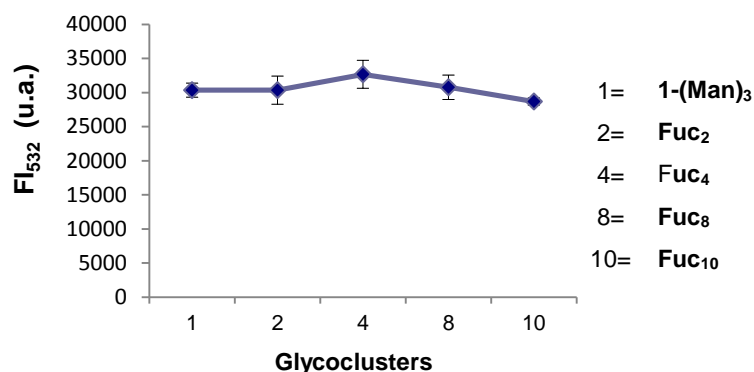


Figure 3-5 Moyenne des intensités de fluorescence du Cy3 à 532nm (u.a.) en fonction du nombre de fucose. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 64 répétitions

Nous avons également étudié l'effet de la charge sur les rendements d'hybridation des glycoclusters portés par des séquences ADN différentes (Tableau 3-3).

Glycoclusters	Valence	Zip code	Charge	Géométrie
1-(Man) ₃	3	Zip 1.1	0	Linéaire en peigne (DMCH)
2-(Gal) ₄	4	Zip 1.10	0	Linéaire en peigne (DMCH)
3-(Gal) ₄ ³⁻	4	Zip 1.7	-3	Linéaire en peigne (Thme)
4-(Gal) ₄	4	Zip 1.8	0	Linéaire en peigne (Thme)
5-(Gal) ₄ ³⁺	4	Zip 1.9	+3	Linéaire en peigne (Thme)
6-(Gal) ₄ ¹⁻	4	Zip 1.11	-1	Linéaire antenné (Pe)
7-(Gal) ₄ ¹⁺	4	Zip 1.14	+1	Linéaire antenné (Pe)

Tableau 3-3 Caractéristiques des glycoclusters étudiés : valence, zip code associé, leur charge et géométrie.

La Figure 3-6 représente le contrôle d'hybridation pour chaque glycocluster. Chaque valeur correspond à la moyenne des 8 spots de répétition. La déviation standard du signal observé pour les 8 répétitions n'excède pas 1,3% pour chaque glycocluster (homogénéité intra Zip) et la déviation standard du signal observé entre les glycocluster n'excède pas 6,1% (homogénéité inter Zip).

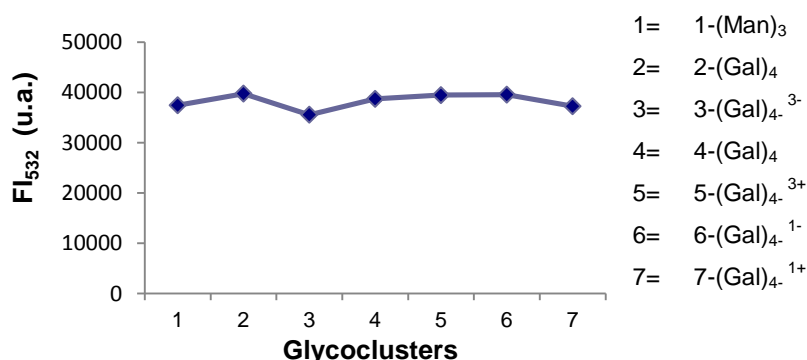


Figure 3-6 Moyenne des intensités de fluorescence du Cy3 à 532nm (u.a.) en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 8 répétitions (Goudot et al. 2013).

Concernant la concentration en glycocluster à hybrider, la faire varier entre 0.001 et 1 μ M permet de déterminer la concentration optimale pour la DDI. La comparaison du signal de fluorescence du sucre-C_Zip-Cy3 à 532nm a permis d'observer l'influence de la concentration en glycocluster sur le taux d'hybridation (*Figure 3-7*).

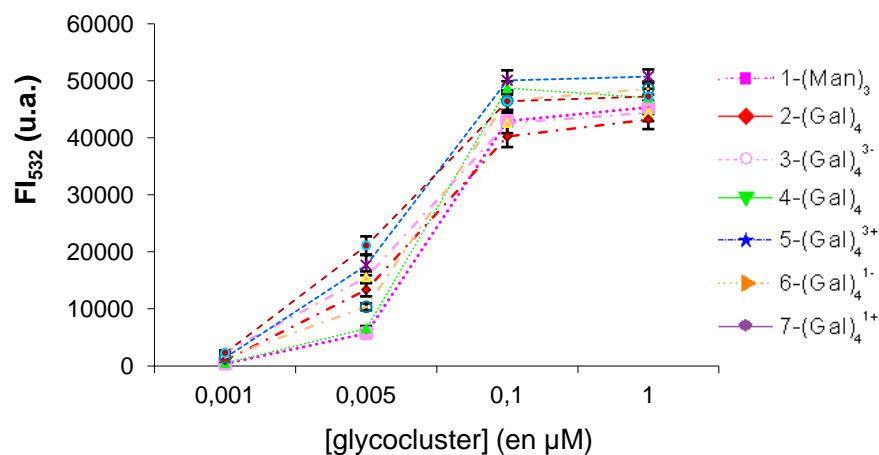


Figure 3-7 Moyenne des intensités de fluorescence du Cy3 à 532nm pour sept glycoclusters hybridés à différentes concentrations : 0.001, 0.005, 0.1 et 1 μ M. (Goudot et al. 2011)

Le signal augmente peu de 0.001 à 0.005 μ M puis augmente rapidement entre 0.005 μ M et 0.1 μ M avant de se stabiliser autour de 45000u.a pour des concentrations supérieures. Dugas *et al.*, utilisant la même chimie de surface, avec des ADN marqués au ³²P, a montré que la densité de brins ADN greffés sur une surface était de l'ordre de 10¹¹ molécules.cm⁻² (Dugas et al. 2004). Une observation AFM a confirmé le même ordre de grandeur : 1,75 à 2,25.10¹¹ molécules.cm⁻² (Lallemand et al. 2007), tandis que la densité de brins hybridés étaient de l'ordre de 1 à 4.10¹⁰ cm⁻² malgré un large excès de brins complémentaires. Cela signifie que le taux d'hybridation des simples brins d'ADN immobilisés est seulement de l'ordre de 10 à 20%. Ainsi, le plateau de saturation observé *Figure 3-7* correspondrait à ce taux d'hybridation de 10 à 20%. La concentration en glycoclusters pour réaliser l'immobilisation DDI a été choisie à 1 μ M dans le PBS_{1x}, pH 7,4.

Il est important de noter que l'hybridation des différentes séquences ADN complémentaires n'est pas influencée par la topologie du glycocluster ni par la nature des linkers, ni par le nombre de résidus ou sa charge. Ainsi il a été possible de tester la bibliothèque de glycoclusters sur le microsystème développé.

3.1.2. Séquences ADN choisies

Parmi les quatorze séquences ADN testées, 11 ont été choisies car elles correspondent aux caractéristiques précisées précédemment : séquences capables de s'hybrider avec des taux d'hybridation similaires et avec un taux de cross-hybridation inférieur à 10% (Figure 3-3). Il s'agit des séquences Zip1.*i* avec *i* = [1-6, 8-11, 13].

Ainsi, comparé aux glycoarray traditionnels, l'immobilisation des glycoclusters via l'hybridation de leur étiquette ADN (DDI) présente les avantages : • d'augmenter l'accessibilité du sucre immobilisé pour la lectine, • de contrôler la densité de surface en sucre via le premier fluorophore Cy3, • d'effectuer la reconnaissance sucre/lectine en solution • et surtout, grâce à la sélectivité de l'hybridation ADN/ADN, de trier les complexes lectine/glycocluster d'un mélange sur le glycoarray. • Grâce à l'identification de 11 séquences d'ADN correspondants à nos critères de spécificité et de rendement d'hybridation, 11 glycoclusters portant chacun une de ces 11 séquences peuvent être testées simultanément dans une même solution (mélange). Cette approche semble, à priori, plus proche de la réalité de l'usage de ces molécules (glycoclusters) comme molécules anti-infectieuses.

3.2. Développement de plusieurs méthodes de mesures d'interactions à l'aide d'un glycoarray : test qualitatif, semi-quantitatif et quantitatif

L'idée est de développer sur la même plateforme trois types d'analyses des interactions glycocluster/lectine. Par plateforme, il est entendu ici qu'il s'agit d'une lame de microscope en verre borosilicaté structurée en un réseau de microréacteurs au fond desquels les 11 séquences Zip choisies sont immobilisées de manière covalente. Les 3 types d'analyses correspondent à **1**) la mesure directe de fluorescence (FI_{635}) observée en point final lors de l'interaction glycocluster avec une lectine marquée Cy5 (ou fluorophore équivalent), **2**) une analyse semi-quantitative (IC_{50}) s'appuyant sur un test de compétition et enfin **3**) une analyse quantitative permettant la détermination des constantes de dissociation (K_d).

3.2.1. Test qualitatif : FI_{635}

Le test qualitatif FI_{635} correspond à la lecture de la fluorescence du fluorophore Alexa647 ou Cy5, incorporé à la lectine, pour une concentration en sucre fixée et une concentration en lectine donnée. Il s'agit de comparer les signaux de fluorescence de l'Alexa647 ou Cy5 pour chaque sucre. Pour chaque essai un témoin négatif (non reconnu par

la lectine) est embarqué. Le signal de fluorescence de l'Alexa647 ou Cy5 correspondant doit être du niveau de celui observé pour le bruit de fond. Pour les autres sucres (ou glycoclusters), le signal permet un classement qualitatif du type meilleur/moins bien. Ainsi, grâce à notre plateforme, il est par exemple possible d'étudier sur une seule lame de microscope, les interactions de 11 glycoclusters différents avec 40 lectines différentes de manière qualitative.

Toutefois, il est important de préciser qu'il existe un effet de FRET* entre le Cy3 et l'Alexa647 présents sur la lame. En effet, un transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) du Cy3 à l'Alexa647 se produit, ce qui nous empêche de détecter le Cy3 lorsqu'ils sont analysés successivement. Ainsi, on observe *Figure 3-8*, qu'avant l'étape de reconnaissance avec la lectine-Alexa647, la lecture de fluorescence du fluorophore Cy3-glycocluster est homogène autour de 45000 u.a. Après reconnaissance et scan de la même lame aux deux longueurs d'ondes, on remarque *Figure 3-9* que le signal du Cy3 est diminué autour de 5000 u.a.

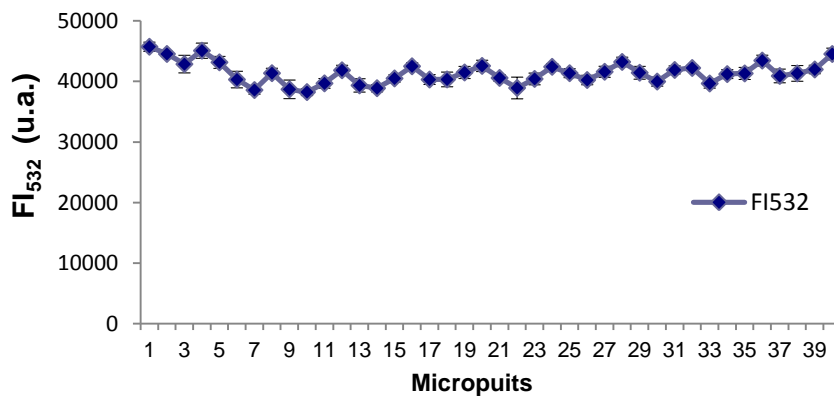


Figure 3-8 Moyenne des intensités de fluorescence du Cy3 à 532nm (u.a.) en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 64 répétitions.

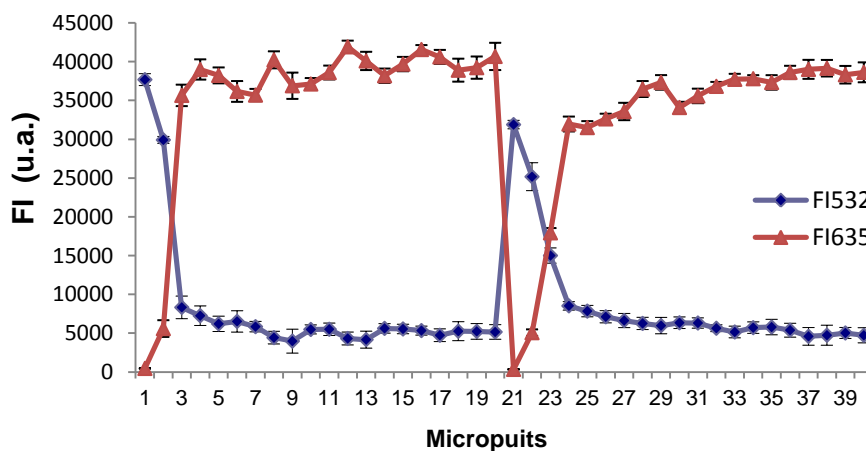


Figure 3-9 Moyenne des intensités de fluorescence du Cy3 à 532nm (◇) et de l'Alexa647 (Δ) à 635nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 64 répétitions.

Ce phénomène est décrit pour la première fois par Förster en 1946. D'après la théorie de Förster, le FRET est défini comme un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) résultant d'une interaction dipôle – dipôle entre deux entités (donneur et accepteur d'énergie). Ce phénomène physique résulte d'une compatibilité énergétique entre ces molécules. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur recouvre, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur.

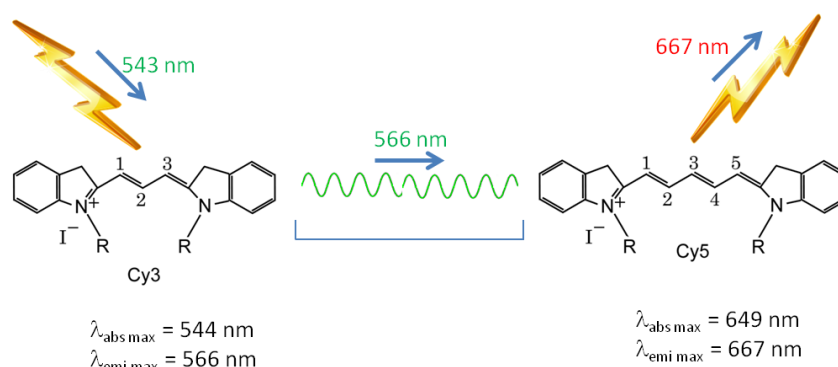


Figure 3-10 Schéma représentant le phénomène de transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (Cy3 et Cy5)

Nous pouvons conclure que la méthode DDI « sur support » nous permet d'effectuer un contrôle qualité de l'immobilisation grâce au scan du Cy3 avant reconnaissance avec la lectine marquée. Néanmoins si la méthode DDI « en solution » est effectuée il n'est plus possible d'effectuer ce contrôle qualité à cause de ce phénomène de FRET existant entre les deux fluorophores Cy3 et Alexa647, sauf si l'on utilise éventuellement un autre fluorophore émettant à une longueur d'onde différente.

3.2.1.1. Mise en place de l'expérience du test qualitatif

L'exemple présenté ci-dessous a été réalisé avec les sept glycoclusters du *Tableau 3-3* vis-à-vis de la lectine PA-IL suivant les étapes expérimentales expliquées dans le chapitre 2. La dernière étape est réalisée simplement en incubant, dans un puits de la lame, les glycoclusters à $1\mu\text{M}$ avec PA-IL à $0.12\mu\text{M}$ dans le PBS_{1x}, pH 7.4, en présence de CaCl₂ et de BSA_{4%} (*Figure 3-11*).

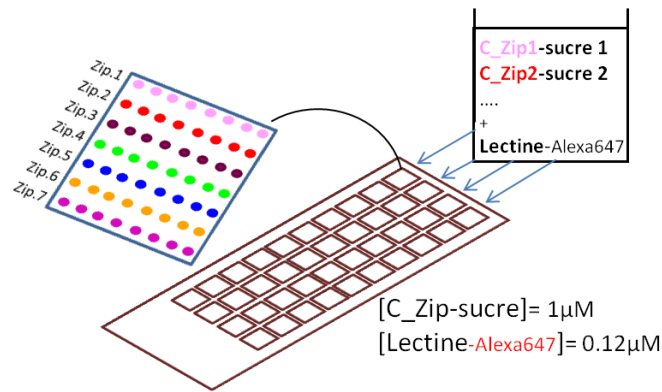


Figure 3-11 Schéma explicatif de l'analyse qualitative (FI_{635}), méthode « en solution ». Adapté de (Goudot et al. 2013)

3.2.1.2. Résultats

Dans cet exemple il s'agit de l'étude d'interactions entre la lectine PA-IL avec les glycoclusters listés *Tableau 3-3*. Après incubation des complexes glycocluster/lectine formés en solution, la lame a été scannée aux deux longueurs d'ondes 532nm et 635nm. La *Figure 3-12a*, représentant la photo de la lecture du signal du Cy3 à 532nm, montre qu'après incubation et lavages, les glycoclusters sont toujours présents sur la puce. La lecture du signal de l'Alexa647 à 635nm (*Figure 3-12b*) montre qu'après incubation et lavages, certains glycoclusters sont plus ou moins bien reconnus par la lectine PA-IL car les intensités de fluorescence sont plus ou moins élevées.

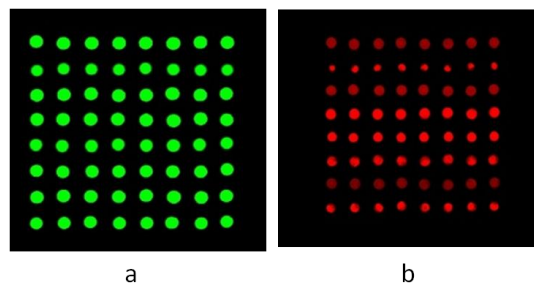


Figure 3-12 Photos du scan d'un puits pour la mesure qualitative FI_{635} . Lecture du signal du Cy3- C_Zip -glycocluster à 532nm (a) et de l'Alexa647-lectine à 635nm (b)

La *Figure 3-13* représente les intensités de fluorescence à 635nm pour chaque glycocluster. Chaque valeur correspond à la moyenne de la répétition de 8 spots identiques.

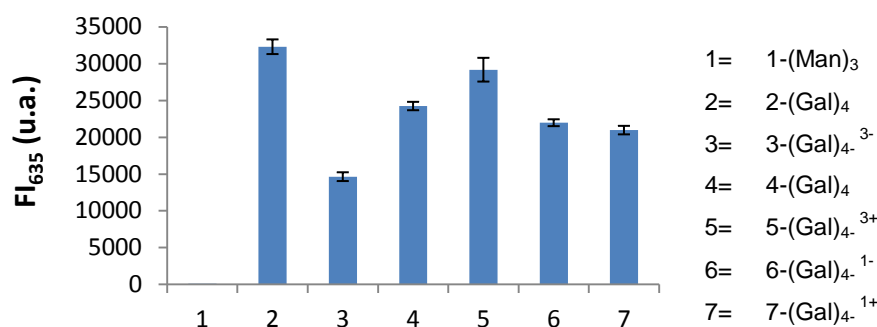


Figure 3-13 Moyenne des intensités de fluorescence (en u.a.) de l'Alexa647 à 635nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 8 répétitions.

3.2.1.3. Discussion des résultats et conclusion

Suite à la lecture directe de fluorescente pour l'analyse qualitative, les mesures de fluorescence, pour chaque glycocluster, sont présentées par valeurs croissantes (Tableau 3-4).

Glycocluster	Valence	Charge	Géométrie	FI ₆₃₅ (u.a.)
1-(Man) ₃	3	0	Linéaire en peigne (DMCH)	99
3-(Gal) ₄ ³⁻	4	-3	Linéaire en peigne (Thme)	14639
7-(Gal) ₄ ¹⁺	4	+1	Linéaire antenne (Pe)	20962
6-(Gal) ₄ ¹⁻	4	-1	Linéaire antenne (Pe)	21966
4-(Gal) ₄	4	0	Linéaire en peigne (Thme)	24233
5-(Gal) ₄ ³⁺	4	+3	Linéaire en peigne (Thme)	29168
2-(Gal) ₄	4	0	Linéaire en peigne (DMCH)	32287

Tableau 3-4 Classement des glycoclusters étudiés par valeurs de FI₆₃₅ croissantes.

Pour rappel, plus le signal de fluorescence de l'Alexa647-PA-IL (FI₆₃₅) est élevé, plus l'affinité glycocluster/lectine est forte. De ce fait, **1-(Man)₃** est bien contrôlé comme témoin négatif car non reconnu par PA-IL. Son intensité de fluorescence se confond avec le bruit de fond : 99u.a. Par contre, les molécules **2-(Gal)₄** et **5-(Gal)₄³⁺** sont les mieux reconnues par PA-IL avec respectivement des intensités de fluorescence de 32287u.a. et 29168u.a.

La lecture de fluorescence directe est une mesure qualitative, il est donc important de coupler ces résultats avec des mesures quantitatives.

3.2.2. Test semi-quantitatif : IC₅₀

Le test semi-quantitatif IC₅₀ correspond à la détermination de la concentration en inhibiteur nécessaire pour atteindre 50% de réduction du signal de fluorescence de l'Alexa647 correspondant à la présence de la lectine. Il s'agit d'un test de compétition entre un inhibiteur en solution et un glycocluster immobilisé par DDI vis-à-vis d'une lectine.

Dans notre cas, pour des concentrations en lectine et glycoclusters fixées mais avec ajout d'un inhibiteur à concentration croissante, la lecture de fluorescence de l'Alexa647 permettra de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour chaque glycocluster. Les inhibiteurs choisis pour ces expériences sont soit le lactose (avec PA-IL), soit le L-fucose (avec PA-III). Ce qu'il faut retenir est que plus l'IC₅₀ mesuré est élevé, plus l'affinité glycocluster/lectine est forte. En effet, l'IC₅₀ élevé signifie que la concentration en inhibiteur doit être élevée pour déplacer 50% de l'interaction glycocluster/lectine.

3.2.2.1. Mise en place de l'expérience du test semi-quantitatif

L'exemple présenté ci-dessous a été réalisé avec les sept galactocusters du *Tableau 3-3* vis-à-vis de la lectine PA-IL suivant les étapes expérimentales expliquées dans le Chapitre 2. La dernière étape est réalisée simplement en incubant, dans un puits de la lame, les sept glycoclusters à 1 μM avec PA-IL à 0.12 μM dans le PBS_{1x}, pH 7.4, en présence de CaCl₂ et de BSA_{4%} et à concentration en lactose croissante (*Figure 3-14*). Un gradient de vingt concentrations en lactose a été utilisé : de 0,01 nM à 300 mM. Chaque microréacteur (ou puits) représente une réaction indépendante.

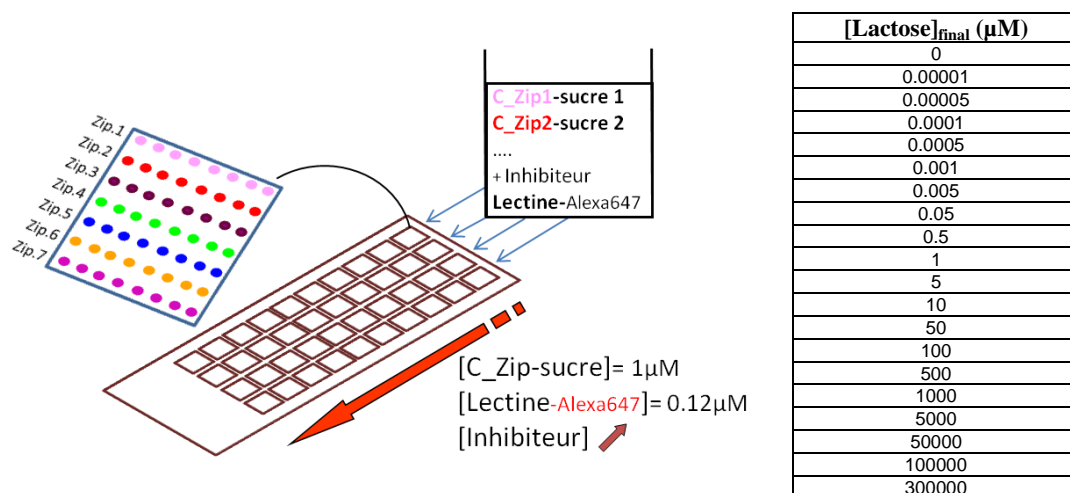


Figure 3-14 Schéma explicatif de l'analyse semi-quantitative (IC₅₀) méthode « en solution » et le gradient de concentration en lactose choisi. Adapté de (Goudot et al. 2013)

3.2.2.2. Résultats

La *Figure 3-15* ci-dessous montre que l'hybridation d'un glycocluster n'est pas influencée par l'augmentation de la concentration en lactose lors de la mesure des IC₅₀.

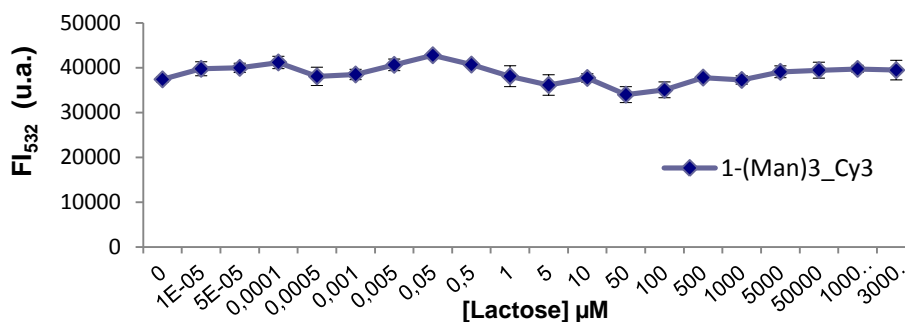


Figure 3-15 Moyenne des intensités de fluorescence du 1-(Man)₃-Cy3 à 532nm (u.a.) en fonction de la concentration en lactose. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 8 répétitions.

La Figure 3-16a, photo de la lecture du signal du Cy3, montre qu'après incubation et lavages, les sucres sont toujours présents sur la puce. La lecture du signal de l'Alexa647 à 635nm (Figure 3-16b) montre qu'après incubation et lavages, le signal de fluorescence à 635nm est diminué lorsque la concentration en inhibiteur lactose augmente. En effet, les complexes lactose/PA-IL-Alexa647 sont éliminés au lavage car le lactose n'est pas lié à la surface du glycoarray par hybridation.

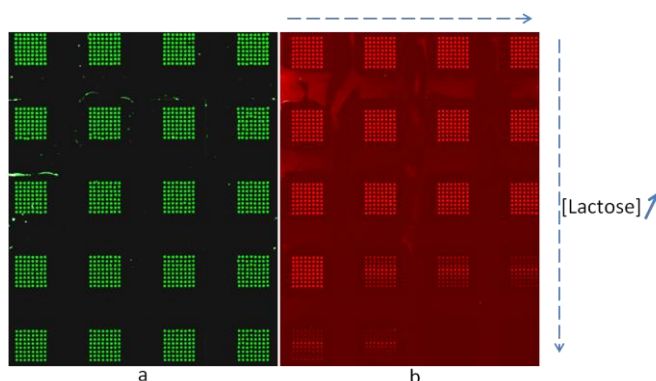


Figure 3-16 Photos du scan de la lame pour la mesure semi-quantitative IC₅₀. Lecture du signal Cy3-C_Zip-glycocluster à 532nm (a) et de PA-IL-Alexa647 à 635nm (b)

Après vérification de la bonne hybridation de tous les glycoclusters puis correction du signal à 635nm avec le signal à 532nm normalisé il est désormais possible de mesurer les IC₅₀. En tant qu'exemple, la Figure 3-17 présente la moyenne des intensités de fluorescence à 635nm du glycocluster 5-(Gal)₄³⁺ en fonction du logarithme de la concentration en inhibiteur lactose.

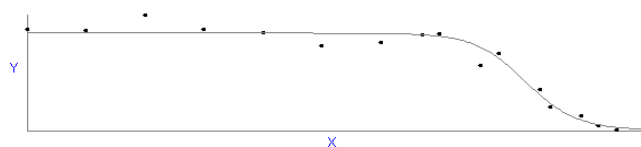


Figure 3-17 $Y=FI_{635}$ (u.a.) en fonction de $X=\log[\text{Lactose}]$ pour le glycocluster 5-(Gal)₄³⁺ déterminé via le logiciel BioDataFit 1.02, « Sigmoidal (Log EC₅₀) ».

3.2.2.3. Discussion des résultats et conclusion

Les résultats de l'analyse semi-quantitative par valeurs d'IC₅₀ croissantes sont rassemblés dans le *Tableau 3-5*. Grâce à l'utilisation de la lame microstructurée, les 7 valeurs d'IC₅₀ correspondants aux 7 glycoclusters ont été déterminées en une seule expérience, en utilisant une seule lame de verre et avec une grande précision : les R² allant de 0,83 à 0,95.

Glycocluster	Valence	Charge	Géométrie	IC ₅₀ (μM)
1-(Man)₃	3	0	Linéaire en peigne (DMCH)	ND
3-(Gal)₄³⁻	4	-3	Linéaire en peigne (Thme)	3
6-(Gal)₄¹⁻	4	-1	Linéaire antenné (Pe)	3
4-(Gal)₄	4	0	Linéaire en peigne (Thme)	10
7-(Gal)₄¹⁺	4	+1	Linéaire antenné (Pe)	37
5-(Gal)₄³⁺	4	+3	Linéaire en peigne (Thme)	695
2-(Gal)₄	4	0	Linéaire en peigne (DMCH)	770

Tableau 3-5 Classement des glycoclusters étudiés par valeurs d'IC₅₀ croissantes

L'IC₅₀ du témoin négatif **1-(Man)₃** ne peut pas être déterminé car ce dernier n'est pas reconnu par PA-IL. Par contre, les molécules **2-(Gal)₄** et **5-(Gal)₄³⁺** sont identifiés comme les glycoclusters les mieux reconnus par PA-IL avec respectivement les IC₅₀ les plus élevés : 770μM et 695μM.

Il est important de noter que les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées par une échelle logarithmique de concentration. C'est pourquoi l'IC₅₀ est considéré comme une mesure semi-quantitative. Afin que la mesure soit exploitable il faut un gradient de concentration suffisamment élevé (20 concentrations différentes) et qu'il y ait suffisamment de points dans la zone d'inflexion.

3.2.3. Test quantitatif : K_d

Le test quantitatif K_d correspond à la détermination, à l'équilibre du système, de la quantité de lectine pour laquelle la moitié des glycoclusters immobilisés sont en interaction avec la lectine. Ainsi, plus le K_d est faible, plus l'affinité glycocluster/lectine est forte. En effet, cela signifie qu'il suffit d'avoir une faible concentration en lectine pour saturer à 50% les glycoclusters. Il s'agit ici d'augmenter la concentration en lectine pour une concentration fixe de glycoclusters immobilisés par DDI. D'après plusieurs articles (Gordus and MacBeath 2006; Liang et al. 2007; Park and Shin 2007), dont les protocoles ont été adaptés pour les glycoarrays par DDI, la détermination des K_d est possible si et seulement si le système correspond aux hypothèses d'adsorption de Langmuir décrites dans le *Chapitre 1*.

Pour notre étude, afin de valider les hypothèses de Langmuir, nous avons supposé que notre surface (lame de verre microstructurée et fonctionnalisée chimiquement avec des silanes et des ADN monobrins) est homogène. De plus, nous supposons que les lectines se lient en monocouche aux glycoclusters hybridés, que le nombre de glycoclusters ne varie pas dans le temps et que le taux de recouvrement est constant et de l'ordre de 10^{11} molécules par cm^2 . La distance entre 2 glycoclusters est de l'ordre 50-60 nm donc on suppose qu'il n'y a pas de gêne stérique entre les lectines adsorbées sur deux sites voisins. Chaque interaction lectine/sucre est considérée comme indépendante.

Ainsi, il a été possible de tracer les isothermes de Langmuir pour chaque glycocluster en faisant varier la concentration en lectine. Sur notre plateforme il est donc possible de déterminer les K_d de 11 glycoclusters (en fait 10 car il y a un témoin négatif) sur une lame de microscope. Les coefficients de dissociation K_d se déterminent par la lecture de l'ordonnée à l'origine des régressions linéaires de Langmuir de chaque isotherme.

$$\frac{[Lectine]}{FI} = \frac{1}{FI_{\max}} \times [Lectine] + \frac{Kd}{FI_{\max}}$$

Équation 3-1 Equation de détermination de la constante de dissociation K_d pour l'étude des interactions lectine/sucre sur une surface

où FI correspond au signal de fluorescence observé pour un glycocluster à une concentration en lectine donnée. FI_{\max} correspond au maximum de fluorescence observé pour ce glycocluster étudié. Et enfin, $[Lectine]$ est la concentration en lectine marquée.

3.2.3.1. Mise en place de l'expérience du test quantitatif

L'exemple présenté ci-dessous a été réalisé avec les sept galactoclusters du *Tableau 3-3* vis-à-vis de la lectine PA-IL suivant les étapes expérimentales expliquées dans le chapitre 2. La dernière étape est réalisée simplement en incubant, dans 1 puits de la lame, les sept glycoclusters à $1\mu\text{M}$ dans le PBS_{1x} , pH 7.4 en présence de CaCl_2 et de $\text{BSA}_{4\%}$ avec un gradient de concentration en PA-IL variant de 0 à 2400nM . Chaque microréacteur (ou puits) représente une réaction indépendante (*Figure 3-18*).

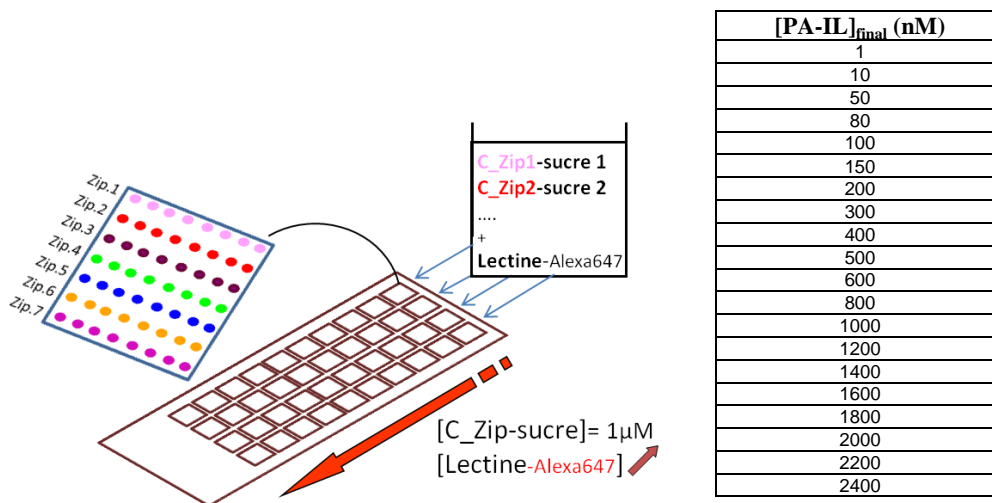


Figure 3-18 Schéma explicatif de l'analyse quantitative (K_d) méthode « en solution » et le gradient de concentration en PA-IL choisi. Adapté de (Goudot et al. 2013)

3.2.3.2. Résultats

La Figure 3-19 montre que l'hybridation d'un glycocluster n'est pas influencée par la concentration en lectine (pour cet exemple : PA-IL) lors de la mesure des K_d .

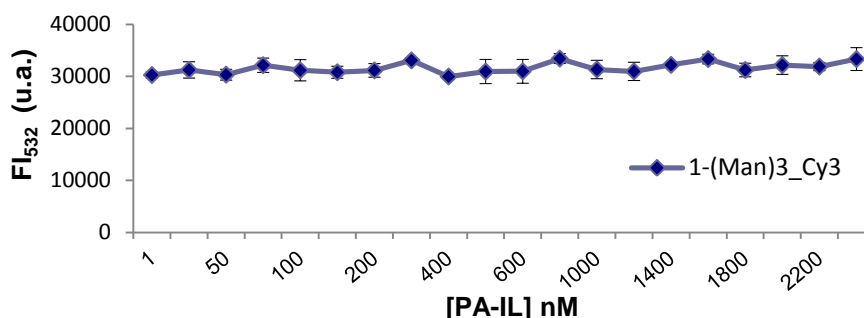


Figure 3-19 Moyenne des intensités de fluorescence du 1-(Man)₃-Cy3 à 532nm (u.a.) en fonction de la concentration en lectine. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 8 répétitions.

Après vérification de la bonne hybridation de tous les glycoclusters puis correction du signal à 635nm avec le signal normalisé à 532nm, il est désormais possible de mesurer les K_d . La Figure 3-20a, représentant la photo de la lecture du signal du Cy3 à 532nm, montre qu'après incubation et lavages, les sucres sont toujours présents sur la puce. La lecture du signal de l'Alexa647 à 635nm (Figure 3-20b) montre qu'après incubation et lavages, le signal de fluorescence est augmenté lorsque la concentration en lectine augmente. En effet, plus la concentration en PA-IL marquée est élevée, plus il y a de complexes glycocluster/lectine hybridés, donc plus le signal de l'Alexa647 est élevé.

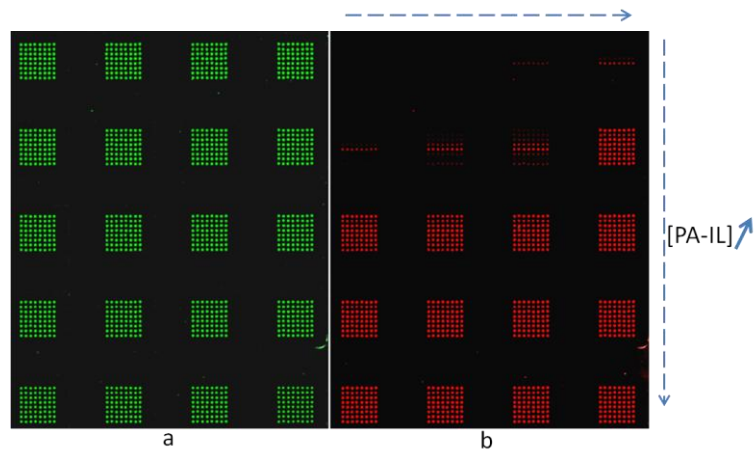


Figure 3-20 Photos du scan de la lame pour la mesure quantitative K_d . Lecture du signal Cy3-C_Zip-sucrose à 532nm (a) et de PA-IL-Alexa647 à 635nm quand [PA-IL] augmente (b)

On confirme après analyse des résultats et tracé de la Figure 3-21 que plus la concentration en PA-IL augmente, plus la fluorescence de l’Alexa647-PA-IL augmente. Cette fluorescence augmente jusqu’à atteindre un palier (autour de 30000u.a.) correspondant au moment où tous les glycoclusters immobilisés sont liés à PA-IL. On dit qu’il y a saturation en lectine PA-IL. En effet, le taux de lectine aura beau continuer à augmenter, il n’y aura plus de glycoclusters disponibles pour se lier.

On montre aussi que **1-(Man)₃**, qui est contrôle négatif, n’est effectivement pas reconnu quelque soit la concentration en PA-IL. En effet, l’isotherme correspondant à **1-(Man)₃** est une linéaire avec des valeurs de fluorescence confondues avec le bruit de fond et du même ordre de grandeur de 100 u.a. Par contre, les isothermes des 6 galactocusters présentent des paliers, plus ou moins élevés en fonction de leur affinité plus ou moins élevée vis-à-vis de PA-IL.

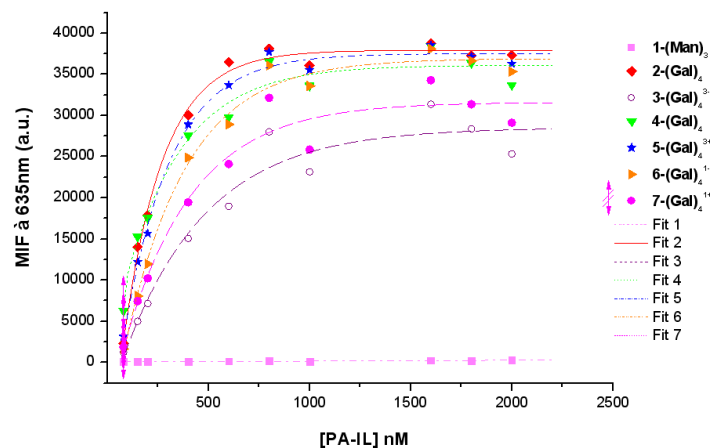


Figure 3-21 Isothermes de Langmuir pour chaque glycocluster. Moyenne des intensités de fluorescence de l’Alexa647 à 635nm (u.a.) en fonction de la concentration en PA-IL-Alexa647. Les barres d’erreurs représentent la déviation standard de 8 répétitions.

Les valeurs de K_d des six tétragalactoclusters sont déterminées grâce à l'Équation 3-1, après lecture de l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire des isothermes de Langmuir présentées Figure 3-22. Ces valeurs sont listées Tableau 3-6.

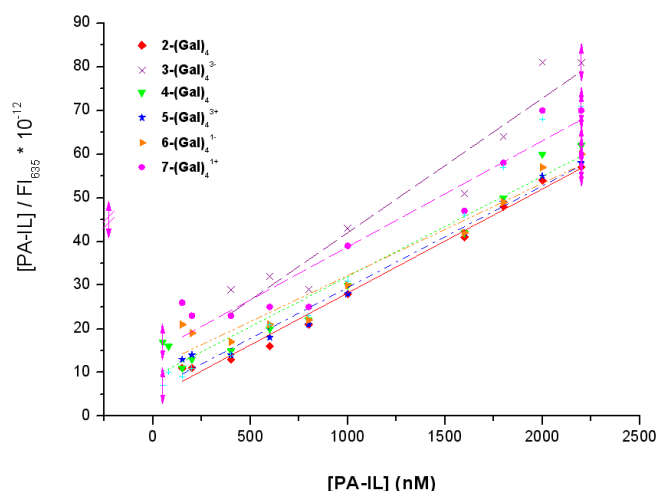


Figure 3-22 Régression linéaire des isothermes de Langmuir pour les 6 tétragalactoclusters afin de déterminer leur K_d

Glycocluster	FI_{\max}	y-interception	K_d (M)	K_d (nM)	R^2
1-(Man) ₃	228	ND	ND	ND	ND
2-(Gal) ₄	37649	4,60E-12	1,7E-07	173	0,99
3-(Gal) ₄ ³⁻	27334	2,23E-11	6,1E-07	610	0,93
4-(Gal) ₄	35733	9,23E-12	3,3E-07	330	0,95
5-(Gal) ₄ ³⁺	37154	6,08E-12	2,3E-07	226	0,98
6-(Gal) ₄ ¹⁻	36130	1,11E-11	4,0E-07	400	0,94
7-(Gal) ₄ ¹⁺	30759	1,46E-11	4,5E-07	448	0,92

Tableau 3-6 Détermination des K_d des 6 tétragalactoclusters

3.2.3.3. Discussion des résultats et conclusion

Pour chaque glycocluster, le Tableau 3-7 présente les résultats de l'analyse quantitative (K_d) par valeurs décroissantes. Grâce à l'utilisation de la lame microstructurée, les valeurs de K_d des 7 glycoclusters ont été déterminées en une seule expérience, en utilisant une seule lame de verre et avec une grande précision : les R^2 allant de 0,92 à 0,99.

Glycocluster	Valence	Charge	Géométrie	K_d (nM)
1-(Man) ₃	3	0	Linéaire en peigne (DMCH)	ND
3-(Gal) ₄ ³⁻	4	-3	Linéaire en peigne (Thme)	610
7-(Gal) ₄ ¹⁺	4	+1	Linéaire antenné (Pe)	448
6-(Gal) ₄ ¹⁻	4	-1	Linéaire antenné (Pe)	400
4-(Gal) ₄	4	0	Linéaire en peigne (Thme)	330
5-(Gal) ₄ ³⁺	4	+3	Linéaire en peigne (Thme)	226
2-(Gal) ₄	4	0	Linéaire en peigne (DMCH)	173

Tableau 3-7 Classement des glycoclusters étudiés par valeurs de K_d décroissantes

Le K_d du témoin négatif **1-(Man)₃** ne peut pas être déterminé ; ce dernier n'étant pas reconnu par PA-IL. Par contre, les molécules **2-(Gal)₄** et **5-(Gal)₄³⁺** sont déterminée comme les glycoclusters les mieux reconnus par PA-IL avec respectivement les K_d les plus faibles : 173nM et 226nM.

3.2.3.4. Comparaison des K_d mesurés par glycoarray et par ITC

La mesure de K_d sur glycoarray peut être réalisée par la méthode DDI « sur puce » ou « en solution ». Toutefois la méthode « en solution » a présenté une limite technique. En effet, pour réaliser cette mesure, il est important de se trouver dans les conditions de Langmuir or *Figure 3-23*, ces conditions ne sont pas respectées pour le tétragalactocluster à bras long Man(EG₂MTz AcNAr-Gal)₄.

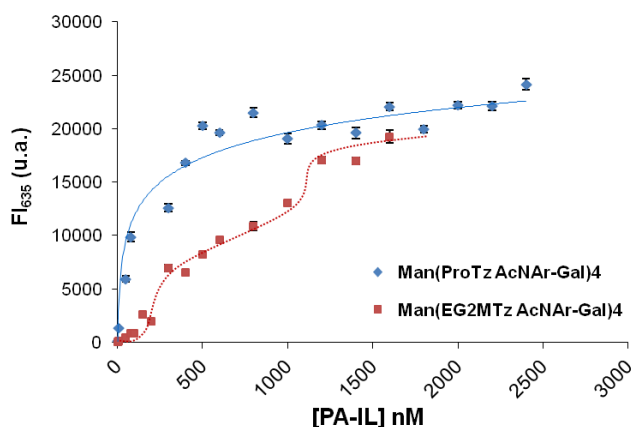


Figure 3-23 FI₆₃₅ de l'Alexa647_PA-IL en fonction de la concentration en PA-IL pour les tétragalactoclusters à bras court : Man(ProTz AcNAr-Gal)₄ (♦) et à bras long : Man(EG₂MTz AcNAr-Gal)₄ (□) _ Méthode DDI « en solution »

Contrairement à la courbe en bleu (♦), la courbe en rouge (□) présente 2 paliers caractéristiques d'une isotherme où plusieurs couches sont adsorbées et se forment les unes après les autres (Donohue and Aranovich 1998). Ainsi, il n'est pas possible, dans ce cas là, de déterminer le K_d . Le même phénomène a été observé vis-à-vis de la lectine PA-IIL pour le tétrafucocluster à bras long Man(EG₂MTz EG₃-Fuc)₄ (*Figure 3-24*). De même que précédemment, contrairement à la courbe en vert (♦), la courbe en violet (□) présente 2 paliers caractéristiques d'une isotherme où plusieurs couches sont adsorbées et se forment les unes après les autres.

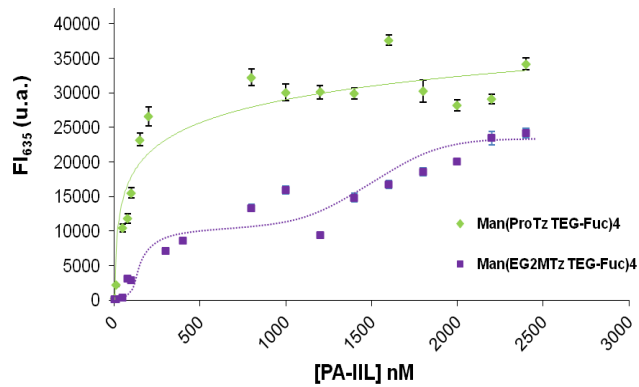


Figure 3-24 FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL en fonction de la concentration en PA-IIL pour les tétrafucoclusters à bras court : $Man(ProTz\ EG_3-Fuc)_4$ (\diamond) et à bras long : $Man(EG_2MTz\ EG_3-Fuc)_4$ (\square) _ Méthode DDI « en solution »

Une hypothèse serait qu'il y ait formation, en solution, d'agrégats glycocluster à bras long/lectine et que leur immobilisation sur glycoarray conduise à une multicouche de matériel biologique. A contrario, les mêmes expériences réalisées avec la méthode DDI « sur puce » ont permis de contourner cette limite et ainsi d'obtenir des isothermes d'adsorption de type de Langmuir même pour les tétraglycoclusters à bras long (Figure 3-25).

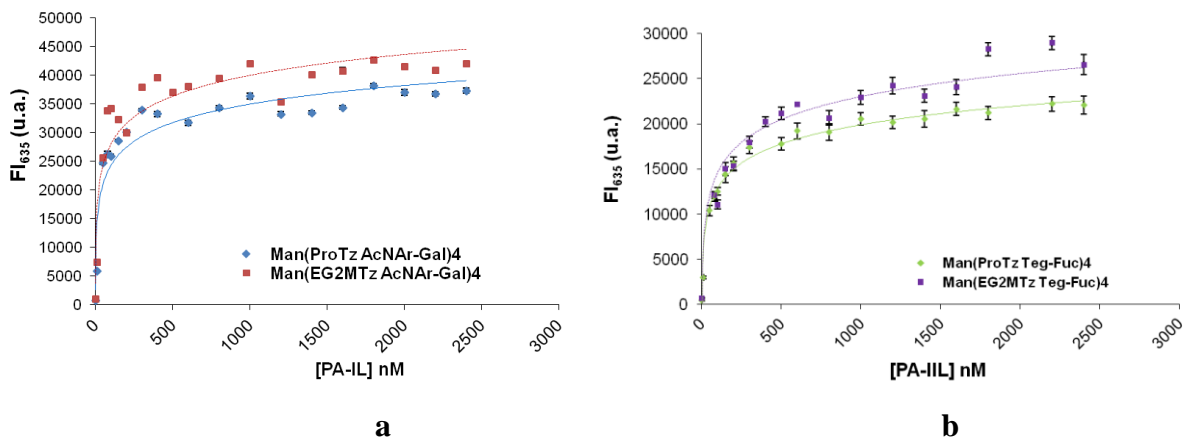


Figure 3-25 FI_{635} des lectines en fonction de la concentration en lectine pour les tétraglycoclusters à bras court et à bras long vis-à-vis de PA-IL (gauche) et de PA-IIL (droite) _ Méthode DDI « sur puce »

Nous pouvons conclure que l'immobilisation des glycoclusters sur glycoarray dans un premier temps puis l'incubation de la lectine à différentes concentrations permet de former une monocouche de matériel biologique quelque soit la longueur du bras linker. Les régressions linéaires des isothermes et les tableaux récapitulatifs de détermination des K_d sont présentés Figure 3-26 et Tableau 3-8.

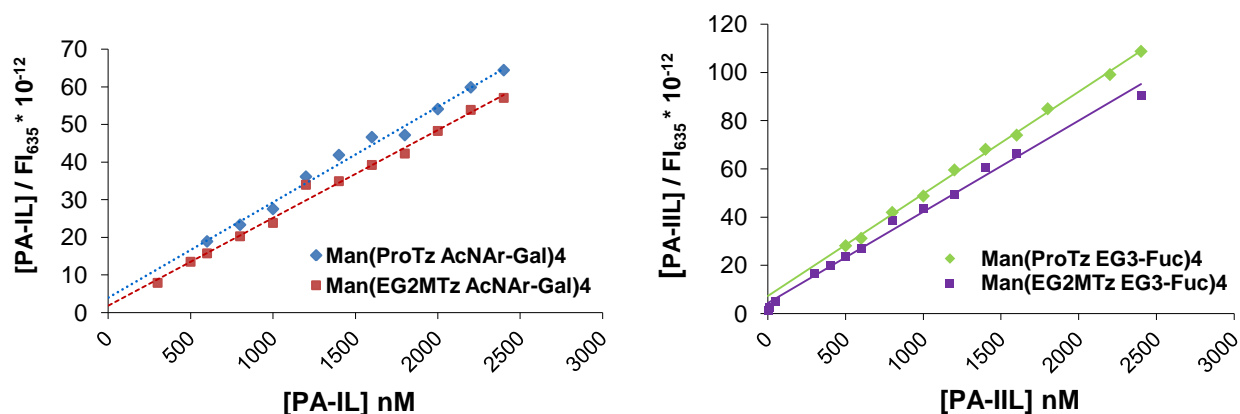


Figure 3-26 Régression linéaire des isothermes de Langmuir pour les tétraglycoclusters à bras court et à bras long vis-à-vis de PA-IL (gauche) et de PA-IIL (droite) _ Méthode DDI « sur puce »

Glycoclusters	FImax	y-interception	K_d (M)	K_d (μ M)	R^2
Man(ProTz AcNAr-Gal) ₄	37714	4,6E-12	1,7E-07	173	0.989
Man(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₄	41716	2,0E-12	8,3E-08	83	0.992
Man(ProTz EG ₃ -Fuc) ₄	21187	7,3E-12	1,5E-07	153	0.998
Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	24532	4,4E-12	1,1E-07	109	0.992

Tableau 3-8 Détermination des K_d à partir de l'intersection avec l'axe des ordonnées pour les tétraglycoclusters à bras court et à bras long vis-à-vis de PA-IL et de PA-IIL

Afin de valider notre méthode de mesure de K_d , sur glycoarray, des mesures de K_d par ITC* sur ces glycoclusters, ont été effectuées en parallèle à Grenoble par Caroline LIGEOUR, doctorante à l'IBMM. Les résultats ainsi obtenus sont présentés Tableau 3-9.

Glycoclusters	Glycoarray		ITC			
	K_d (nM) « en solution »	K_d (nM) « sur puce »	K_d (nM)	$-\Delta H$ (kJ.mol ⁻¹)	$-T \Delta S$ (kJ.mol ⁻¹)	$-\Delta G$ (kJ.mol ⁻¹)
Man(ProTz AcNAr-Gal) ₄	196	173	194	81	43	39
Man(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₄	632	83	157	78	39	39
Man(ProTz EG ₃ -Fuc) ₄	206	153	166	130	91	39
Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	482	109	133	120	81	39

Tableau 3-9 Comparaison des K_d déterminés par glycoarray et par ITC pour les tétraglycoclusters à bras court et à bras long vis-à-vis de PA-IL et de PA-IIL

Ces résultats par ITC viennent confirmer les valeurs déterminées par glycoarray car nous obtenons le même classement des glycoclusters par les deux techniques de mesures d'interaction. En effet, nous remarquons que les valeurs de constante de dissociation (K_d), pour les deux tétragalactocusters, mesurés par DDI-glycoarray (méthode « sur puce ») et ITC sont du même ordre de grandeur. En ce qui concerne la méthode « en solution » les résultats

sont identiques à l'ITC seulement pour le bras court Man(ProMTz EG₃-Fuc)₄ (196 à 194 nM respectivement) comme expliqué précédemment.

De même pour les tétrafucoclusters vis-à-vis de PA-IIL. Les valeurs de constante de dissociation (K_d), pour les deux tétrafucoclusters, mesurés par glycoarray et ITC sont du même ordre de grandeur. En ce qui concerne la méthode « en solution » les résultats sont similaires à l'ITC seulement pour le bras court Man(ProMTz EG₃-Fuc)₄ (206 à 166nM respectivement) pour la même raison.

3.2.1. Comparaison des résultats issus des 3 tests et discussion

Le *Tableau 3-10* rassemble l'ensemble des données d'affinité obtenues par trois méthodes différentes et indépendantes pour 7 glycoclusters y compris un contrôle négatif. Il est important de noter que les classements des glycoclusters par FI₆₃₅ et IC₅₀ croissants et par K_d décroissants sont les mêmes. Ce qu'il faut retenir ici est que le galactocluster **2-(Gal)₄** présente les FI₆₃₅ et IC₅₀ les plus élevés et le K_d le plus faible parmi les sept glycoclusters testés. Les 3 méthodes d'analyses d'interactions par glycoarray aboutissent au même résultat.

Glycocluster	Valence	Charge	Géométrie	FI ₆₃₅ (u.a.)	IC ₅₀ (μM)	K_d (nM)
1-(Man)₃	3	0	Linéaire en peigne (DMCH)	99	ND	ND
3-(Gal)₄³⁻	4	-3	Linéaire en peigne (Thme)	14639	3	610
7-(Gal)₄¹⁺	4	+1	Linéaire antenné (Pe)	20962	37	448
6-(Gal)₄¹⁻	4	-1	Linéaire antenné (Pe)	21966	3	400
4-(Gal)₄	4	0	Linéaire en peigne (Thme)	24233	10	330
5-(Gal)₄³⁺	4	+3	Linéaire en peigne (Thme)	29168	695	226
2-(Gal)₄	4	0	Linéaire en peigne (DMCH)	32287	770	173

Tableau 3-10 Classement des glycoclusters étudiés par valeurs de FI₆₃₅ croissantes

Cependant, une divergence a été observée pour la molécule **7-(Gal)₄¹⁺** entre son classement en fonction des K_d croissants (cinquième meilleure valeur) et son classement en fonction des IC₅₀ (troisième meilleure valeur). Les faibles valeurs de R² (0,91 et 0,83 pour son K_d et son IC₅₀ respectivement) expliquent probablement cette divergence surtout dans le cas des mesures d'IC₅₀ en raison de l'échelle logarithmique. Par conséquent, la détermination des IC₅₀ est bien adaptée pour l'évaluation semi-quantitative de structures présentant une forte affinité avec une lectine. Toutefois, lorsque les affinités de deux glycoclusters pour une lectine sont du même ordre de grandeur, il est nécessaire d'avoir un grand nombre de points expérimentaux et en particulier dans la zone d'inflexion. Dans ce cas, la détermination des valeurs de K_d semble être plus appropriée.

Finalement, l'hypothèse serait que les valeurs des IC_{50} exalteraient les différences d'affinité mesurées entre les molécules. En effet, le ratio des K_d entre **3-(Gal)₄³⁻** et **5-(Gal)₄³⁺** est de 2.69, tandis que le ratio des IC_{50} entre les mêmes molécules est de 231. Des résultats similaires ont également été observés pour la comparaison des valeurs de K_d mesurées par calorimétrie isotherme (ITC) et des valeurs d' IC_{50} déterminées par un test de compétition tel que la méthode immuno-enzymatique (ELLA) (Cecioni et al. 2009). Cette différence de classement entre les deux techniques semi-quantitative et quantitative n'est pas surprenante puisque l'interaction est quantifiée différemment. Pour l' IC_{50} il s'agit d'un test de compétition entre trois entités : un ligand, un récepteur et un inhibiteur, tandis que pour le K_d il s'agit de la détermination d'un paramètre caractérisant la force de la liaison. Lundquist *et al.* ont déjà soulevé ce problème (Lundquist and Toone 2002). En effet, ils ont rapporté qu'il pouvait exister une relation entre l'importance de l'effet cluster et la méthode d'analyse utilisée entraînant des variations considérables dans les valeurs d' IC_{50} et de K_d mesurées. Ils ont par exemple mis en valeur la différence d'ampleur de l'effet cluster de 86 par ITC, 150 par SPR, 45000 par la méthode ELLA et 150000 par HIA. Chaque analyse fonctionne dans de larges gammes de concentrations et surtout mesure des propriétés physiques différentes, il est probable que ce soit le type d'analyse qui soit à l'origine de ces écarts.

Dans tous les cas, à l'issue de toutes ces analyses, il serait intéressant de coupler les résultats obtenus à une modélisation réalisée à l'aide des mesures quantitatives biophysiques et des données biologiques connues afin de prédire le comportement cellulaire comme l'explique MacBeath (Jones et al. 2006).

3.3. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre que l'utilisation de la DDI-glycoarray permettait de multiplexer les analyses d'interactions entre onze glycoclusters vis-à-vis d'une lectine. Cette technique présente de nombreux avantages si et seulement si les séquences ADN choisies répondent à certains critères de sélectivité et de spécificité.

Trois méthodes d'analyses différentes par DDI-glycoarray, utilisant de très faibles quantités de matière biologique (solutions de 1 μ L à 1 μ M c'est à dire 1x40 = 40 picomoles de glycoclusters et 10 μ L à 11 μ M c'est à dire 110 picomoles de lectine), ont été développées et comparées pour l'étude de la relation entre structure et affinité dirigeant l'interaction lectine/sucre. La lecture de fluorescence directe (FI₆₃₅), apportant des informations qualitatives, est suffisante pour un dépistage rapide d'une bibliothèque de molécules.

Néanmoins, elle doit être corroborée par des données quantitatives telles que les déterminations d'IC₅₀ et de K_d . Cette étude montre qu'avec le même microsystème, il est possible d'effectuer des mesures qualitatives et quantitatives et que la mesure de K_d par glycoarray concorde avec les mesures d'ITC. Il est toutefois nécessaire, pour la méthode en solution, de se situer dans les conditions de Langmuir afin de mesurer les K_d . Si néanmoins ces dernières n'étaient pas respectées, nous avons remarqué que la méthode sur puce permettait dans tous les cas de s'en assurer, sans formation d'agrégats possibles, et ainsi d'obtenir les valeurs de K_d désirées.

Chapitre 4

Etude d'affinité sur glycoarray

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les glycoarray étaient des outils performants pour cribler une bibliothèque de glycoclusters synthétisés chimiquement vis-à-vis de lectines bactériennes. Des tests qualitatifs, semi-quantitatifs et quantitatifs peuvent être réalisés simultanément afin de comparer l'affinité de ces glycoclusters vis-à-vis de ces lectines. L'étude des paramètres qui influent positivement sur l'augmentation de l'affinité des glycoclusters pour une lectine bactérienne ou virale donnée permettra d'aboutir à la détermination d'un traitement potentiel contre la bactérie ou le virus correspondant.

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est le troisième plus important pathogène dans le cas des infections nosocomiales, présentant des mécanismes de résistances multiples vis-à-vis des antibiotiques. Il s'agit donc de trouver une alternative aux antibiotiques contre cette bactérie notamment en ciblant les facteurs de virulence impliqués dans la formation et la stabilisation du biofilm dans l'organisme. Afin de développer des molécules inhibitrices de l'adhésion de PA, appelées glycoclusters, nous avons choisi de nous focaliser sur trois de ses facteurs de virulence : les lectines cibles de cette étude sont PA-IL, PA-IIL et FliD.

Dans ce quatrième chapitre nous présentons les résultats des analyses d'affinité de plusieurs glycoclusters sur ces facteurs de virulence. Nous donnons tout d'abord les résultats du criblage d'une bibliothèque de galactoclusters vis-à-vis de la lectine PA-IL, puis d'une bibliothèque de fucoclusters vis-à-vis de PA-IIL et finalement ceux de la bibliothèque de galactoclusters vis-à-vis de la lectine FliD. En particulier l'influence de certains paramètres comme la géométrie tridimensionnelle, la charge, la position de l'aglycone* aromatique, la rigidité du bras espaceur et la longueur du bras espaceur et du nombre de résidus terminaux a été étudiée. En effet, la stratégie de la chimie de l'ADN (*H*-phosphonate et phosphoramidite) combinée à la cycloaddition 1,3 de Huisgen alkyne/azide catalysée par le cuivre, a permis la synthèse à façon de ces glycoclusters (Pourceau et al. 2008). Chaque glycocluster porte son étiquette ADN simple brin (séquence différente d'oligodeoxynucléotide notée C_Zip) qui permet ensuite de l'adresser sur le spot contenant le Zip code correspondant du glycoarray développé au laboratoire. Les deux lectines PA-IL et PA-IIL nous ont été fournies par Dr.

Anne IMBERTY (CERMAV, Grenoble). Elles ont été préparées par voie recombinante dans *Escherichia coli* puis purifiées par chromatographie d'affinité. Les lectines, lyophilisées, ont été marquées à l'Alexa647 au laboratoire puis conservées à -24°C. La lectine FliD nous a été fournie par Dr. Olivier VIDAL (UGSF, Lille). Elle a été préparée par voie recombinante dans *Escherichia coli* puis purifiée par chromatographie d'affinité. Toutefois le groupement tag-histidine n'a pas pu être éliminé après purification sous peine de détruire la structure tridimensionnelle, donc l'activité biologique, de la lectine. Elle a été marquée à l'Alexa647 à Lille puis conservée à +4°C.

4.1. Etude d'affinité sur PA-IL

Nous avons vu dans le *Chapitre 1* que PA-IL, lectine tétravalente spécifique du galactose, présente une structure particulière où les quatre sites de liaison au galactose sont disposés sur les quatre sommets d'un rectangle. Les galactoclusters synthétisés pour cette étude présentent différents types de linkers et différentes topologies afin de déterminer les paramètres physiques et thermodynamiques intra et intermoléculaires favorisant la meilleure insertion des résidus galactoses dans les multiples sites de liaisons des lectines.

Pour l'étude sur DDI-glycoarray, tous les glycoclusters sont portés par une « étiquette ADN » (Zip code) afin d'être immobilisés par hybridation de l'ADN dirigée (par DDI). Un fluorophore Cy3 a été incorporé à chaque séquence ADN afin de contrôler l'hybridation par fluorescence (notée FI₅₃₂). La lecture de l'intensité de fluorescence à 635 nm du fluorophore Alexa 647 lié à la lectine PA-IL (notée FI₆₃₅) permet d'étudier l'interaction sucre/lectine. Leur structure générale est représentée ci-dessous *Figure 4-1*.

4.1.1. Glycoclusters étudiés

Dans cette étude, quatre familles de glycoclusters ont été évaluées :

- 1) Les linéaires en peigne via un cœur DMCH ou Thme avec un nombre de résidus terminaux variant de 1 à 5 (*Figure 4-1a*). L'effet d'un espace entre les bras a été testé grâce au triglycocluster linéaire en peigne représenté (*Figure 4-1b*).
- 2) Les linéaires antennés via un cœur Pe ou mannitol avec 4, 5, ou 10 résidus terminaux (*Figure 4-1c*).
- 3) Les cœurs centrés hexoses via un cœur Man, Gal ou Glc avec 4 ou 8 résidus terminaux (*Figure 4-1d*).
- 4) Les cœurs centrés pentoses via un cœur Ara, Ribo ou Xylo avec 3 résidus terminaux (*Figure 4-1e*).

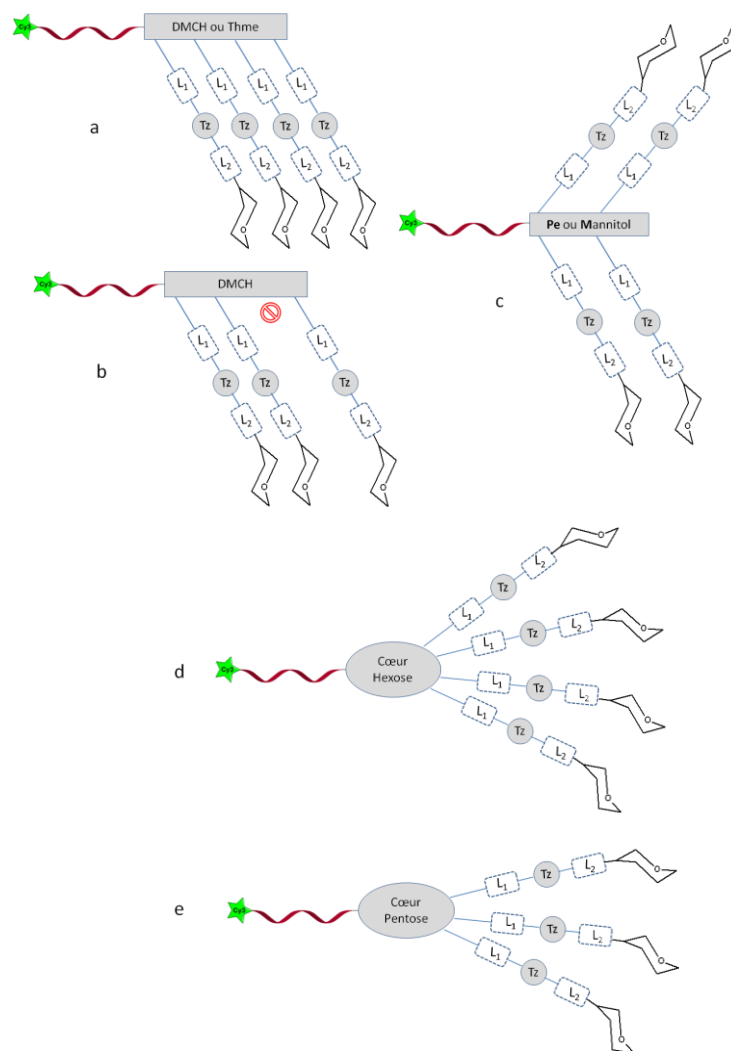


Figure 4-1 Structure générale des glycoclusters linéaires en peigne (a et b), antenné (c) ou à cœur centré hexose (d) ou pentose (e) portés par un ADN-Cy3. L1=Linker 1 reliant le squelette phosphorylé (cœur) au triazole (Tz) et L2=Linker 2 reliant le triazole au résidu terminal

Les squelettes phosphorylés DMCH, Thme, Pe, mannitol ou cœur centré ainsi que la nature et le nombre des bras nous permettent de faire varier plusieurs paramètres sur la structure puis d'étudier leur influence quant à leur interaction avec les lectines bactériennes.

4.1.2. Influence de la charge

La charge du bras espaceur joue un rôle clé. Elle pourrait permettre d'apporter des interactions supplémentaires avec les acides aminés situés près du site de reconnaissance de la lectine (CRD « *Carbohydrate Recognition Domain* »). Ces interactions électrostatiques supplémentaires entraîneraient une augmentation de la liaison spécifique. Afin de déterminer les clusters multivalents possédant une haute affinité pour PA-IL, l'influence de la charge du linker a été étudiée sur DDI-glycoarray.

4.1.2.1. Glycoclusters étudiés



Le témoin négatif : **1-(Man)₃** ou plus précisément (DMCH-MTz EG₃-Man)₃ présente trois mannoses en résidus terminaux avec le linker linéaire dimethanolcyclohexane (DMCH). Le mannose n'étant pas reconnu par PA-IL, il ne devrait pas y avoir d'interaction entre ce dernier et la lectine donc nous ne devrions pas observer de signal de fluorescence pour ce glycoconjugué.

Puis les glycoclusters multivalents présentant différentes topologies (linéaire ou antenné) et différents environnements électroniques (positif, négatif ou neutre) sont étudiés vis-à-vis de la lectine PA-IL, spécifique du galactose. Etant donné que PA-IL est une lectine tétravalente, nous avons décidé de synthétiser des glycoclusters comportant tous 4 galactoses en résidus terminaux. Ci-dessous, le tableau listant les structures (*Tableau 4-1*) récapitule leurs caractéristiques.

Glycoclusters	Valence	Zip code	Charge	Géométrie
1-(Man)₃ _ (DMCH-MTz EG ₃ -Man) ₃	3	Zip 1.1	0	Linéaire en peigne (DMCH)
2-(Gal)₄ _ (DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	Zip 1.1	0	Linéaire en peigne (DMCH)
3-(Gal)₄³⁻ _ (Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁻	4	Zip 1.7	-3	Linéaire en peigne (Thme)
4-(Gal)₄ _ (Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	Zip 1.8	0	Linéaire en peigne (Thme))
5-(Gal)₄³⁺ _ (Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁺	4	Zip 1.9	+3	Linéaire en peigne (Thme))
6-(Gal)₄¹⁻ _ (Pe-MTz EG ₃ -Gal ₂) ₂ ¹⁻	4	Zip 1.11	-1	Linéaire antenné (Pe)
7-(Gal)₄¹⁺ _ (Pe-MTz EG ₃ -Gal ₂) ₂ ¹⁺	4	Zip 1.14	+1	Linéaire antenné (Pe)

Tableau 4-1 Caractéristiques des glycomimétiques étudiés : valence, Zip code associé, leur charge et géométrie.

DMCH=Diméthanolcyclohexane, Thme= 1,1,1-(trishydroxyméthyl)ethane, Pe= Pentaerythritol

Deux tétragalactoclusters linéaires avec une géométrie « en peigne » et non chargés (neutre) : le **2-(Gal)₄** construit avec le linker dimethanolcyclohexane (DMCH) et le **4-(Gal)₄** construit avec le linker 1,1,1-(trishydroxyméthyl)ethane (Thme). Deux tétragalactoclusters chargés négativement : le **3-(Gal)₄³⁻** construit avec le linker linéaire « en peigne » Thme et le **6-(Gal)₄¹⁻** construit avec le linker linéaire « antenné » pentaerythritol (Pe). Et enfin, deux tétragalactoclusters chargés positivement : le **5-(Gal)₄³⁺** et le **7-(Gal)₄¹⁺** construits avec les linkers Thme _ linéaire « en peigne »_ et Pe _ linéaire « antenné »_ respectivement. Leur structure développée est présentée Annexe 1.

4.1.2.2. Étude sur DDI-glycoarray

Le tableau ci-dessous, récapitulant les valeurs de FI₆₃₅, d'IC₅₀ et de K_d, nous permet de discuter de l'affinité des différents glycoclusters par rapport à la lectine PA-IL (*Tableau 4-2*).

Glycocluster	Charge	Géométrie	FI ₆₃₅ (u.a.)	IC ₅₀ (µM)	K _d (nM)
1-(Man) ₃ -(DMCH-MTzEG ₃ -Man) ₃	0	Linéaire en peigne (DMCH)	99	ND	ND
3-(Gal) ₄ ³⁻ -(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁻	-3	Linéaire en peigne (Thme)	14639	3	610
7-(Gal) ₄ ¹⁺ -(Pe-MTz EG ₃ -Gal) ₂ ¹⁺	+1	Linéaire antenne (Pe)	20962	37	448
6-(Gal) ₄ ¹⁻ -(Pe-MTz EG ₃ -Gal) ₂ ¹⁻	-1	Linéaire antenne (Pe)	21966	3	400
4-(Gal) ₄ -(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄	0	Linéaire en peigne (Thme)	24233	10	330
5-(Gal) ₄ ³⁺ -(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁺	+3	Linéaire en peigne (Thme)	29168	695	226
2-(Gal) ₄ -(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₄	0	Linéaire en peigne (DMCH)	32287	770	173

Tableau 4-2 Classement des glycoclusters étudiés par valeurs de FI₆₃₅ croissantes

Pour rappel, plus l'affinité sucre/lectine est forte, plus la FI₆₃₅ et l'IC₅₀ doivent être élevés et plus le K_d doit être faible. De ce fait, le trimannosylcluster linéaire (DMCH-MTz EG₃-Man)₃ est un bon contrôle négatif car il n'a aucune interaction avec PA-IL (FI₆₃₅= 99 u.a.). Cela confirme ainsi la reconnaissance sélective de la lectine. Ce témoin permet également de contrôler l'absence d'interactions non spécifiques à la surface de la puce. Par contre, les glycoclusters (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄ et (Thme-MTz EG₃-Gal)₄³⁺ sont les mieux reconnus par PA-IL avec respectivement des intensités de fluorescence de 32287 u.a. et 29168 u.a.

On remarque que pour une même topologie (série linéaire en peigne à cœur Thme), l'affinité de PA-IL est (Thme-MTz EG₃-Gal)₄³⁺ > (Thme-MTz EG₃-Gal)₄ > (Thme-MTz EG₃-Gal)₄³⁻. En effet, le K_d est 1,4 fois plus faible pour le triplement chargé positivement comparé au neutre puis est encore 1,8 fois plus faible entre le neutre et le triplement chargé négativement. Corrélativement, leurs IC₅₀ augmentent de 3, 10 et 695 µM respectivement pour le négatif, neutre et positif. Ainsi, il semblerait que l'interaction PA-IL / galactocuster soit favorisée par un environnement chargé positivement et défavorisée par l'environnement chargé négativement. On pourrait expliquer cette hypothèse par le point isoélectrique (pI) de la lectine PA-IL qui vaut 4.94. En effet, à pH 7.4, la lectine PA-IL est chargée négativement et de nouvelles liaisons électrostatiques pourraient être présentes avec les glycoclusters chargés positivement. L'augmentation de l'affinité, du glycomimétique triplement chargé positivement, (Thme-MTz EG₃-Gal)₄³⁺, vis-à-vis de PA-IL, pourrait résulter d'interactions électrostatiques favorables entre la lectine et le squelette phosphorylé.

D'autre part, et bien que le tétragalactocuster linéaire en peigne (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄ soit neutre, il présente tout de même une FI₆₃₅ et un IC₅₀ les plus élevés et un K_d le plus faible parmi toutes les molécules testées. Nous pouvons conclure qu'outre la charge positive, d'autres facteurs permettent de favoriser l'affinité vis-à-vis de PA-IL. Facteurs que nous avons étudiés par la suite (topologie, nature des linkers, etc.).

De cette étude sur l'influence de la charge sur l'affinité sucre/lectine, deux structures retiennent notre attention quant à leur haute affinité vis-à-vis de PA-IL : (Thme-MTz EG₃-Gal)₄³⁺ et (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄. En comparant leurs valeurs de FI₆₃₅, d'IC₅₀ et de *K_d*, il est apparu que la charge positive était favorable à l'interaction PA-IL/galactocluster. Toutefois, il ne suffit pas seulement que le glycocluster présente des charges positives car le glycocluster linéaire et neutre (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄, a été le mieux reconnu par PA-IL. En effet, il semblerait que la topologie joue également une grande importance. Ainsi, de nouveaux glycoclusters possédant différentes topologies ont été étudiés.

4.1.3. Influence de la topologie sur l'interaction

Chapitre 1 partie 1.3, il a été précisé que la topologie d'un glycocluster était un facteur important quant à l'optimisation de sa liaison avec une lectine. Idéalement, la topologie des résidus galactoses doit exactement correspondre, à l'échelle atomique, aux sites de liaison de la lectine pour une amélioration maximale de l'affinité. Toutefois, il faut noter que cette structure est inatteignable. Ainsi, bien que la topologie soit optimisée, il est également nécessaire que les bras présentent une certaine flexibilité dans leurs linkers afin de pouvoir s'adapter à la poche de reconnaissance de la lectine. Ceci implique alors un coût entropique « à payer ». Concernant la topologie, sa variation a été rendue possible par le choix du cœur : linéaire DMCH ou Thme, cœur centré hexose ou pentose (*Figure 4-1*).

4.1.3.1. *Glycoclusters étudiés*

Dans cette partie, parmi les sept glycoclusters étudiés dans la *partie 4.1.2* et afin de se concentrer sur l'influence de la topologie, nous nous sommes seulement focalisés sur les deux tétragalactoclusters neutres. Il s'agit des linéaires « en peigne » (Thme-MTz EG₃-Gal)₄ et (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄, ce dernier a d'ailleurs été considéré comme témoin positif. Ils correspondent à la structure générale notée « a » sur la *Figure 4-1*. D'autres linéaires en peigne ont été construits avec le squelette phosphorylé contenant un DMCH [(DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄] et l'autre une désoxythymidine [(dT-MTz AcNAr-Gal)₄] afin de les comparer au témoin positif. De plus six tétragalactoclusters à cœur centrés hexoses ont été synthétisés ainsi que six triglycoclusters cœur centrés pentoses. Ils correspondent aux structures générales notées « d et e » sur la *Figure 4-1*.

Pour les cœurs centrés hexoses, afin de déterminer l'effet de la direction des hydroxyles sur l'affinité, les cœurs mannose, glucose ou galactose ont été synthétisés avec chacun des linkers différents (aromatiques ou aliphatiques). Puis l'effet des trois cœurs

centrés hexoses (cycle à 6 atomes) a été comparé aux trois cœurs centrés pentoses (cycle à 5 atomes) : arabinose, xylose et ribose, construits avec des bras espaceurs différents : courts ou longs (propyle et diéthylène glycol méthyle respectivement). Tous sont listés ci-dessous *Tableau 4-3*.

Glycoclusters	L1	L2	Topologie	Valence
1-(Man)₃_DMCH-(MTz EG₃-Man)₃	M	EG ₃	/	/
4-(Gal)₄_(Thme-MTz EG₃-Gal)₄	M	EG ₃	linéaire en peigne	4
2-(Gal)₄_(DMCH-MTz EG₃-Gal)₄	M	EG ₃	linéaire en peigne	4
DMCH-(MTz AcNAr-Gal) ₄	M	AcNAr	linéaire en peigne	4
(dT-MTz AcNAr-Gal) ₄	M	AcNAr	linéaire en peigne	4
Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	pro	AcNAr	Cœur centré hexose	4
Gal(proTz AcNAr-Gal) ₄	pro	AcNAr	Cœur centré hexose	4
Glc(proTz AcNAr-Gal) ₄	pro	AcNAr	Cœur centré hexose	4
Man(hexTz M-Gal) ₄	hex	M	Cœur centré hexose	4
Gal(hexTz M-Gal) ₄	hex	M	Cœur centré hexose	4
Glc(hexTz M-Gal) ₄	hex	M	Cœur centré hexose	4
Ara(proTz AcNAr-Gal) ₃	pro	AcNAr	Cœur centré pentose	3
Xylo(proTz AcNAr-Gal) ₃	pro	AcNAr	Cœur centré pentose	3
Ribo(proTz AcNAr-Gal) ₃	pro	AcNAr	Cœur centré pentose	3
Ara(EG ₂ M Tz AcNAr-Gal) ₃	EG ₂ M	AcNAr	Cœur centré pentose	3
Xylo(EG ₂ M Tz AcNAr-Gal) ₃	EG ₂ M	AcNAr	Cœur centré pentose	3
Ribo(EG ₂ M Tz AcNAr-Gal) ₃	EG ₂ M	AcNAr	Cœur centré pentose	3
DMCH-(MTz AcNAr-Gal) ₁₁₀₁	M	AcNAr	linéaire en peigne	3

Tableau 4-3 Glycoclusters étudiés

4.1.3.2. Étude sur DDI-glycoarray

Dans cette troisième étude, nous avons examiné l'effet de la topologie du glycocluster avec un linker aliphatique (L2= M ou EG₃) ou aromatique (L2=AcNAr).

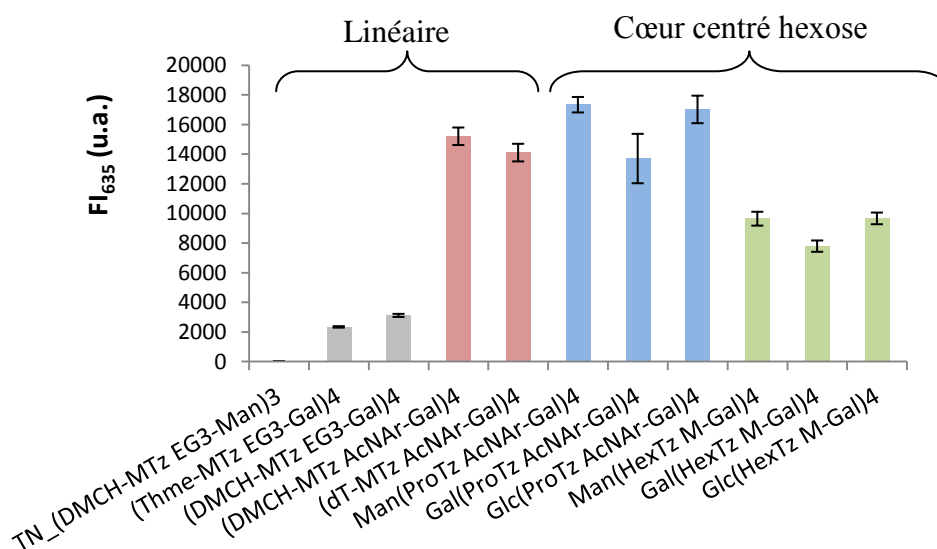


Figure 4-2 Moyenne des FI₆₃₅ de l'Alexa647_PA-IL pour le témoin négatif (TN) et les dix galactoclusters : 4 linéaires et 6 cœurs centrés mannose

Figure 4-2, concernant les deux tétragalactoclusters non chargés et linéaires en peigne (Thme-MTz EG₃-Gal)₄ et (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄ (barres en gris), le cœur DMCH (8 atomes) a une affinité 1.3 plus élevée pour PA-IL que le cœur Thme (5 atomes). Ainsi, le nombre d'atome constituant le squelette phosphorylé (cœur) pourrait être l'explication de leur différence d'affinité d'une part (Figure 4-3).

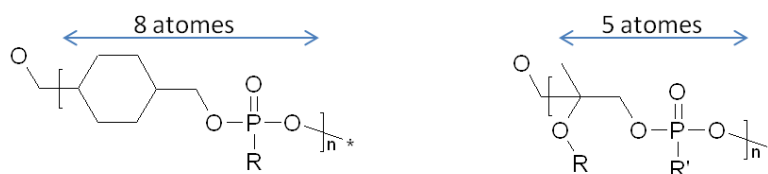


Figure 4-3 Représentation des squelettes phosphorylés DMCH (gauche) et Thme (droite) avec leur nombre d'atomes les constituant.

D'autre part, cette plus haute affinité pourrait également être expliquée par la rigidité plus élevée du DMCH par rapport au Thme. Cette propriété d'augmenter l'affinité vis-à-vis de PA-IL a été rapportée récemment (Pertici and Pieters 2012). En effet, la rigidité du DMCH conduirait à une diminution du coût entropique lors de l'interaction avec la lectine.

Il apparaît aussi Figure 4-2 (barres en rouge) que le linéaire DMCH [(DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄ à 15213 u.a.] avec un lien phosphoramidate portant les linkers (MTz-AcNAr) est légèrement mieux reconnu que le linéaire avec un nucléoside thymidine [(dT-MTz AcNAr-Gal)₄ à 14111 u.a.] avec les mêmes linkers. Encore une fois, le cœur DMCH semble induire une topologie adaptée à la poche de reconnaissance de PA-IL.

D'autres topologies ont été testées comme les cœurs centrés hexoses. Les tétraglycoclusters cœur mannose, galactose et glucose ont été synthétisés avec chacun les linkers (ProTz AcNAr) (barres en bleu Figure 4-2) ou (HexTz M) (barres en vert Figure 4-2). Il semblerait que la topologie engendrée par le cœur mannose soit la mieux adaptée car le cœur mannose Man(ProTz AcNAr-Gal)₄ (FI₆₃₅ = 17344 u.a.) est mieux reconnu que le cœur glucose Glc(ProTz AcNAr-Gal)₄ (à 17026 u.a.), lui-même mieux reconnu que le cœur galactose Gal(ProTz AcNAr-Gal)₄ (à 13710 u.a.). Toutefois on remarque qu'avec un linker différent de type HexTz M, le classement des topologies n'est pas le même. En effet, dans ce cas ce sont les cœurs mannose et glucose qui semblent les plus adaptés avec une FI₆₃₅ d'environ 9660 u.a. puis le cœur galactoses avec Gal(hexTz M-Gal)₄ à 7797 u.a.

L'effet du linker sera discuté dans la partie suivante (partie 4.1.4). Entre la topologie engendrée par le cœur mannose d'une part et le galactose et glucose d'autre part (structures générales représentées ci-dessous Figure 4-4), la configuration spatiale est relativement identique à l'exception du carbone en position 2 (en rouge sur la figure). L'inversion de

configuration de l'hydroxyle lié au carbone 2 du cœur (bras espaceur orienté au dessus du cycle) semble induire la plus forte augmentation d'affinité vis-à-vis de PA-IL : cœur mannose > glucose et galactose. Une hypothèse serait que la configuration spatiale du glycocluster imposée par le cœur mannose favoriserait les liaisons hydrogènes entre les hydroxyles du galactose avec les acides carboxyliques des acides aminés présents dans la poche de reconnaissance de la lectine. Nous pouvons conclure que la topologie cœur centré mannose permet la meilleure augmentation d'affinité vis-à-vis de PA-IL.

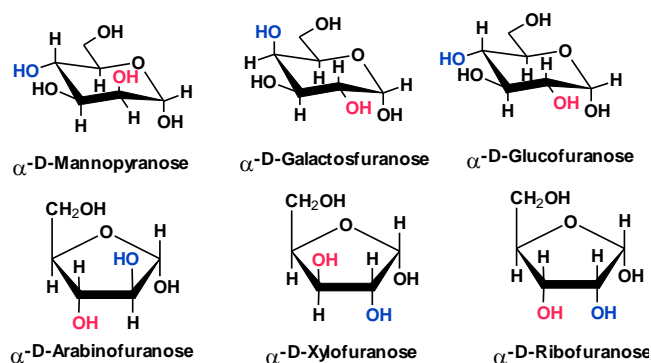


Figure 4-4 Représentation des différents cœurs centrés hexose (cycle à 6 carbones) et pentose (cycle à 5 carbones)

Les valeurs d'IC₅₀ mesurées (Tableau 4-4) confirment les résultats de fluorescence directe à savoir que le cœur DMCH > Thme et que pour le linker (proTz AcNAr) le classement des cœurs est le suivant : Man > Glc > Gal. Toutefois, nous remarquons encore une divergence dans le classement des IC₅₀ lorsque les glycoclusters sont plus faiblement reconnus comme avec le linker (HexTz AcNAr). En effet, avec ce linker, le classement suivant les IC₅₀ décroissants aboutit à : Glc > Gal > Man tandis qu'il était de Glc + Man > Gal suivant les FI₆₃₅ décroissants.

Galactoclusters	Nombre de galactose	IC ₅₀ (μM)	Efficacité relative	Efficacité relative par résidu
(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₁	1	5	1	1
4-(Gal)₄ _(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	3.5	0,7	30
2-(Gal)₄ _(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	773	155	38.7
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₄	4	1056	211	52.8
Man(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	314	63	15.8
Gal(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	532	106	26.5
Glc(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	775	155	39
Gal(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	662	132	33
Glc(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	805	161	40
Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	3700	740	185

Tableau 4-4 IC₅₀ des différents galactoclusters étudiés avec leur efficacité relative par rapport au monomère (DMCH-MTz EG₃-Gal)₁ puis leur efficacité relative par résidu galactose

Au final, les structures (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄ et Man(proTz AcNAr-Gal)₄ présentent les IC₅₀ les plus élevés avec respectivement des efficacités relatives par résidu de 53 et 185 par rapport au monovalent (DMCH-MTz EG₃-Gal)₁ donc ont le plus d'affinité pour PA-IL. L'effet du linker sera discuté dans la partie suivante mais il semblerait que le L2=AcNAr soit favorable.

Puis pour comparer avec les cœurs centrés manno-hexose (cycle à 6 carbones), trois cœurs pentoses différents (arabinose, xylose et ribose) ont été construits avec des linkers plus ou moins longs et flexibles (respectivement L1=propyle ou diéthylène glycol méthyle) afin d'étudier l'effet de la direction des hydroxyles sur l'affinité et si des ligands trivalents sont suffisants.

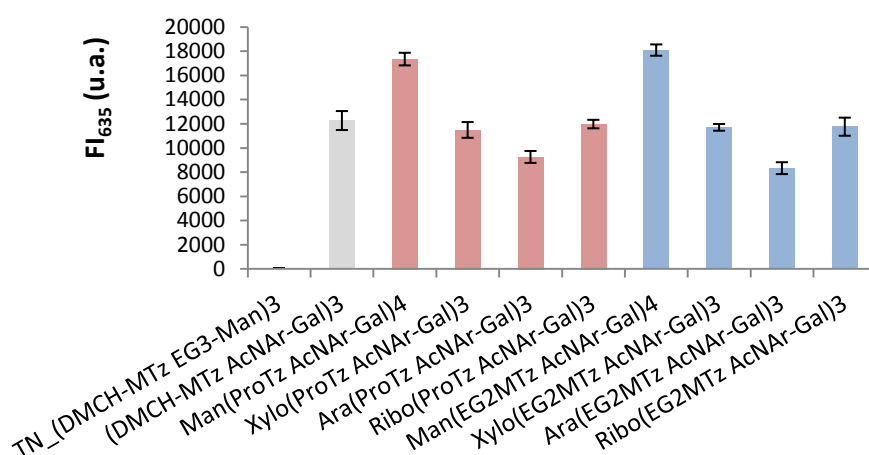


Figure 4-5 Moyenne des FI₆₃₅ de l'Alexa647_PA-IL pour le témoin négatif (TN), les six galactoclusters cœurs centrés pentose bras court (L2=Pro) et bras long (L2=EG₂) comparés aux deux cœurs centrés manno-hexose possédant les mêmes linkers.

Il apparaît Figure 4-5 que quelque soit le cœur centré pentose (arabinose, xylose ou ribose) et quelque soit le linker L1 (court et rigide pour L1=Pro_ barres en rouge_ ou long et flexible pour L1=EG₂M_ barres en bleu_), ils sont moins bien reconnus que les topologies cœur centré mannose avec 6 atomes. Plus précisément nous avons ribose > xylose > arabinose mais avec des moyennes des intensités de fluorescence à 635 nm (FI₆₃₅) de l'ordre de 11000 u.a. contre 17344 u.a. pour Man(ProTz AcNAr-Gal)₄ et 18089 u.a. pour Man(EG₂Tz AcNAr-Gal)₄. Néanmoins, il est difficile de conclure quant à l'influence de cette topologie centrée à 5 atomes car elle induit la présence de seulement 3 résidus terminaux contre 4 pour la série centrée à 6 atomes.

Nous notons toutefois que, comme pour la série hexose, l'inversion de configuration de l'hydroxyle lié au carbone 2 du cœur induit la plus forte modification de l'affinité. Néanmoins contrairement à cette dernière, le bras espaceur lié au carbone 2 orienté au dessus du cycle est

défavorable. En effet, arabinose < xylose + ribose tandis que mannose > glucose + galactose (voir *Figure 4-4*).

De plus, par rapport au contrôle positif linéaire et trivalent (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₃ (12263 u.a.), quelque soit le linker L1, ils sont tous moins bien reconnus. Nous pouvons alors conclure que la topologie cœur pentose, aboutissant à des glycoclusters trivalents, ne permet pas d'augmenter de manière significative l'affinité pour PA-IL. De plus, le trigalactocuster (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₁₁₀₁ (*Figure 4-1b*) avait été comparé, sur un autre glycoarray, au trigalactocuster (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₃ et au tétragalactocuster (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄ afin de déterminer si la présence d'un espace entre deux bras consécutifs de la structure linéaire permettait d'augmenter l'affinité pour PA-IL. Sa FI₆₃₅ avait été plus faible que les deux autres donc nous en avons conclu qu'il n'y avait pas de gêne stérique lors de l'interaction PA-IL / (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₃ ou 4. Il est à noter que nous avons fait le choix, par souci de temps et afin de limiter l'utilisation de matériel biologique, de ne pas mesurer les K_d et IC₅₀ de ces structures. La mesure de fluorescence directe nous permet de faire un premier criblage afin de déterminer quelles structures méritent un approfondissement dans cette étude d'interaction avec les mesures d'IC₅₀ et de K_d .

De cette étude sur l'influence de la topologie sur l'affinité sucre/lectine, deux structures retiennent notre attention quant à leur haute affinité vis-à-vis de PA-IL. Il s'agit de (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄ et de Man(ProTz AcNAr-Gal)₄. Toutefois, il semblerait qu'en plus de la topologie, l'influence de la nature du linker et du nombre de résidus terminaux aient une grande importance. Nous allons tout d'abord étudier l'influence des linkers L1 et L2 sur la reconnaissance PA-IL / galactocuster.

4.1.4. Effet des linkers L1 et L2

Afin de déterminer les clusters multivalents possédant une haute affinité pour PA-IL, l'influence de la rigidité et de la longueur de plusieurs linkers a été étudiée sur DDI-glycoarray. La variation du bras espaceur a été possible par le choix des linkers L1 et L2 (*Figure 4-1*).

4.1.4.1. *Glycoclusters étudiés*

Dans cette partie, onze tétragalactocusters cœurs centrés mannose ont été synthétisés pour l'étude, correspondant à la structure générale notée « d » sur la *Figure 4-1*. Différents linkers ont été insérés entre le galactose terminal et le squelette phosphorylé. Ainsi, le nombre d'atomes constituant les linkers a varié de 9 à 23 atomes. Les linkers sont formés de deux

parties notées L1 et L2 qui sont séparées par le groupement triazole formé lors de la réaction de chimie « click ». Ces différentes parties du linker permettent de faire varier l'écart entre les résidus, la rigidité et l'hydrophobicité générale. Tous les glycoclusters étudiés sont listés dans le *Tableau 4-5*. Ils sont classés **1)** selon le linker L1 puis **2)** selon la nature du linker L2 puis **3)** selon le nombre d'atome séparant le résidu terminal galactose du squelette phosphorylé.

Glycoclusters	L1	L2	Nature du linker L2	Nombre d'atomes
1-(Man)₃_(DMCH-MTz EG₃-Man)₃	M	EG ₃	/	/
2-(Gal)₄_(DMCH-MTz EG₃-Gal)₄	M	EG ₃	Flexible et hydrophile	/
Man(proTz Pro-Gal) ₄	pro	Pro	Hydrophobe	9
Man(proTzBuTGal) ₄	pro	BuT	Rigide et liaisons hydrogène	12
Man(proTz EG ₂ -Gal) ₄	pro	EG ₂	Flexible et hydrophile	11
Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄	pro	EG ₃	Flexible et hydrophile	14
Man(proTz DMCH-Gal) ₄	pro	DMCH	Rigide et Hydrophobe	12
Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	pro	AcNAr	Rigide et hydrophobe	13
Man(hexTz M-Gal) ₄	hex	M	Hydrophobe	10
Man(EG ₂ MTz BuT-Gal) ₄	EG ₂ M	BuT	Rigide et liaisons hydrogène	16
Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Gal) ₄	EG ₂ M	EG ₃	Flexible et hydrophile	18
Man(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₄	EG ₂ M	AcNAr	Rigide et hydrophobe	17
Man(EG ₄ MTz AcNAr-Gal) ₄	EG ₄ M	AcNAr	Rigide et hydrophobe	23

Tableau 4-5 Tétraglycoclusters étudiés

Une représentation générale des structures pourrait être celle-ci-dessous *Figure 4-6*. En fonction des linkers constituant le bras espaceur, le nombre d'atome du bras varie de 9 à 23 atomes. Plus précisément et pour étayer la discussion, les différents linkers sont représentés *Figure 4-7*.

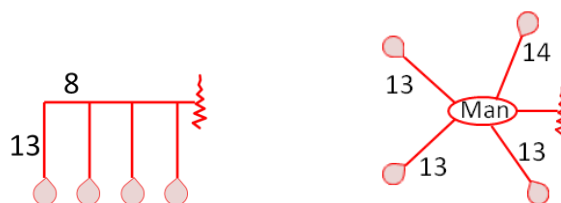


Figure 4-6 Représentation générale des topologies linéaires (gauche) et cœur centré mannose (droite avec le nombre d'atome constituant le squelette phosphorylé et les bras espaceurs. Les exemples choisis sont le linéaire DMCH (8 atomes) portant 4 bras espaceurs MTz EG₃ (13 atomes) et le cœur centré hexose portant 4 bras espaceurs proTz AcNAr (13 atomes).

évidente entre la longueur comptée et le nombre d'atomes sur l'affinité pour PA-IL. En effet, il n'y a pas d'augmentation de l'affinité lorsque le tétragalactocluster passe d'un linker à 9, 11, 12 ou 14 atomes (galactoclusters avec L1= Pro et L2 aliphatique : Pro, EG_{2/3} ou aromatique : DMCH, BuT ou AcNAr) à un tétragalactocluster avec 16 à 18 atomes (galactoclusters avec L1= EG₂ et L2 aliphatique : EG₃ ou aromatique : BuT ou AcNAr). Et plus précisément, pour un même linker L1=Pro, l'affinité n'a pas été améliorée de manière significative pour un glycocluster avec 11 atomes Man(ProTz EG₂-Gal)₄ ou à 14 atomes Man(ProTz EG₃-Gal)₄.

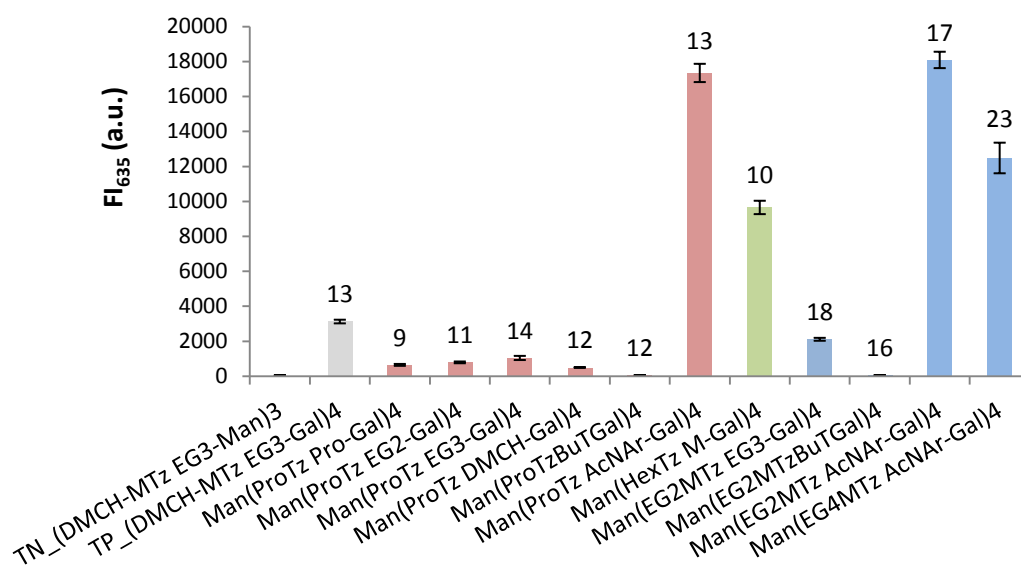


Figure 4-8 Moyenne des FI₆₃₅ de l'Alexa647_PA-IL à 635nm pour les témoins négatif (TN), positif (TP) et les onze galactoclusters. Les chiffres à l'aplomb de chaque barre correspondent au nombre d'atomes constituant le linker (de 9 à 23 atomes).

En étudiant l'effet du linker L1, on remarque que Man(hexTz M-Gal)₄ (FI₆₃₅= de 9649 u.a) est le mieux reconnu des galactoclusters présentant un L2≠ AcNAr. Il semblerait qu'une augmentation de la longueur de L1 soit un paramètre favorable. En effet, en passant de L1= propyle (3 atomes) à L1= hexyle (6 atomes), l'affinité est augmentée d'un facteur 15 car la FI₆₃₅ de Man(proTz pro-Gal)₄ n'est qu'à 641 u.a.

En revanche, en étudiant l'effet du linker L2, il apparaît très clairement que la présence d'un groupement aromatique de type L2= AcNAr près du galactose terminal augmente significativement l'efficacité de la liaison. En effet, les deux séries avec L1= Pro ou EG₂M avec un linker L2 aliphatique type L2= Pro, EG₂ ou EG₃ à un linker L2= AcNAr augmente la FI₆₃₅ d'un facteur 10 environ. Ceci a déjà été observé par Imberty et al. où un groupe phényl-β-D-galactose a augmenté de 26 fois l'affinité du glycocluster pour PA-IL par rapport au groupe méthyl-β-D-galactose (Imberty et al. 2004). Cela pourrait s'expliquer par la

présence d'interactions hydrophobes ou π - π avec les acides aminés aromatiques de PA-IL près du site de reconnaissance de la lectine (CRD). Les équipes de Chen et Stoitsova ont déjà rapporté que l'introduction d'un aglycone anomérique benzyle permettait d'augmenter les interactions hydrophobiques (Chen et al. 1998; Stoitsova et al. 2003). En effet, dans la poche de reconnaissance de PA-IL se trouve les 2 acides aminés aromatiques histidine 50 et tyrosine 36 (*Figure 4-9*).

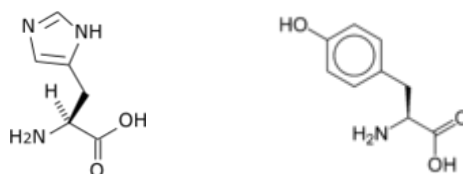


Figure 4-9 Acides aminés aromatiques histidine et tyrosine contenus dans le site de reconnaissance de la lectine PA-IL

Néanmoins, nous pouvons nous demander pourquoi les linkers cycliques L2= DMCH (12 atomes) et aromatique BuT (12 ou 16 atomes en fonction de L1) n'ont pas le même effet que le linker aromatique AcNAr (13, 17 ou 23 atomes en fonction de L1). Man(proTz AcNAr-Gal)₄ présente une FI₆₃₅ de 17344 u.a. contre 494 u.a. pour Man(proTz DMCH-Gal)₄. Concernant L2= DMCH (FI₆₃₅= 494 u.a.), on peut supposer que l'absence de doublets non liant dans le cycle à 6 carbones fait qu'il n'y a pas cette augmentation d'affinité. En effet, avec le phényle du L2= AcNAr, il y a résonance du doublet non liant de la cétone avec l'azote puis du noyau benzénique et de l'oxygène lié au galactose. Cette délocalisation pourrait stabiliser les liaisons et favoriser l'affinité pour PA-IL. Concernant L2= BuT, quelque soit le linker L1 (Pro ou EG₂M) ou le nombre d'atomes (12 ou 16 atomes) et ce, malgré le fait d'avoir un noyau aromatique avec des doublets non liants dans le cycle, les FI₆₃₅ sont de l'ordre de 45 u.a. Il semblerait qu'il y ait gêne stérique de la thymine sur les acides aminés de la poche de reconnaissance de la lectine empêchant le galactose de « rentrer » dans le site d'interaction. En effet, avec L2=AcNAr, le phényle est connecté au galactose par un oxygène alors que dans ce cas, la thymine est directement connectée au galactose par l'azote (*Figure 4-7*).

En se concentrant exclusivement sur les structures cœur centré mannose avec L2= AcNAr, nous avons étudié l'influence de la distance de l'aglycone aromatique avec le cœur mannosylé par comparaison des IC₅₀ et K_d (*Tableau 4-6*).

Glycoclusters	IC ₅₀ (μ M)	Efficacité relative	K _d (nM)
TP_Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄	29	1	419
Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	3700	86	173
Man(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₄	4218	145	83
Man(EG ₃ MTz AcNAr-Gal) ₄	4840	167	28
Man(EG ₄ MTz AcNAr-Gal) ₄	8196	283	11

Tableau 4-6 Comparaison des K_d et des IC₅₀. Efficacité relative calculée par rapport au Man(proTz EG₃-Gal)₄

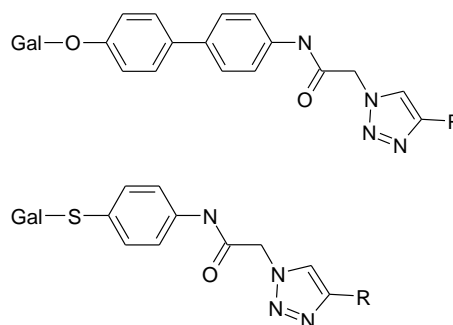
Dans ce cas là, le témoin positif choisi a été le Man(proTz EG₃-Gal)₄. Nous confirmons aisément que le linker L2= AcNAr augmente l'affinité pour PA-IL. Cette affinité est augmentée d'un facteur 86 entre les deux tétragalactocusters présentant le même linker L1: Man(proTz EG₃-Gal)₄ et Man(proTz AcNAr-Gal)₄. Corrélativement le K_d est diminué d'un facteur 2.4 entre ces deux structures. Cette conclusion avait déjà été soulevée par l'équipe de Cecioni *et al.* où le calixarène possédant ce linker aromatique proche du résidu terminal galactose avait affiché une affinité sans précédent vis-à-vis de PA-IL suite aux études effectuées par ELLA, ITC et SPR (Cecioni et al. 2012).

Nous confirmons également que l'augmentation de la longueur de L1 est un paramètre favorable car de L1= pro à EG₂, EG₃ puis EG₄, l'affinité est respectivement augmentée d'un facteur 1.7, 1.2 et 1.7. Il est à noter qu'entre L1= pro et L1= EG_{2/3/4}, la flexibilité augmente également. Il serait intéressant d'une part de déterminer l'optimum à la longueur des bras en synthétisant Man(EG₅ à ₈MTz AcNAr-Gal)₄ par exemple. D'autre part, synthétiser la même structure avec L1= heptyle (7 carbones) ou décyle (10 carbones) par exemple nous aiderait à déterminer lequel des paramètres (longueur ou flexibilité ou hydrosolubilité) a le plus d'influence quant à la reconnaissance vis-à-vis de PA-IL.

De cette étude de l'effet du linker sur l'affinité sucre/lectine, une structure retient particulièrement notre attention quant à sa haute affinité vis-à-vis de PA-IL. Il s'agit de Man(EG₄MTz AcNAr-Gal)₄ qui présente une longueur et flexibilité optimale du linker L1 ainsi qu'un linker L2 aromatique de type AcNAr.

Des perspectives seraient de tester une structure de type Gal-OAr₂NAc-Tz-R afin d'augmenter les interactions π - π hydrophobes :

et une structure de type Gal-S-ArNAc-Tz-R afin d'augmenter sa lipophilie globale et la rendre plus difficilement hydrolysable par les enzymes.



Toutefois, il semblerait également qu'en plus de la topologie et de l'influence des linkers, le nombre de résidus terminaux ait une grande importance. Ainsi, de nouveaux glycoclusters présentant différentes multivalence ont été étudiés.

4.1.5. Influence du nombre de résidus galactose

Nous venons de voir que la série DMCH était la mieux reconnue de toutes les séries linéaires et que la topologie cœur centré mannose ainsi que la présence du linker aromatique L2= AcNAr influait favorablement sur l'affinité vis-à-vis de PA-IL. Ainsi, afin d'étudier l'effet cluster sur l'accessibilité plus ou moins grande des galactoses, des glycoclusters de multivalence différente, avec L2= AcNAr, linéaires et à cœur centré mannose ont été testés.

4.1.5.1. *Glycoclusters étudiés*

Trois octagalactoclusters cœur centré mannose ont été synthétisés : Man[Thme(MTz AcNAr-Gal)₂]₄ et Man(ProTz AcNAr-Gal)₈ et Man[Thme(MTz BuT-Gal)₂]₄. Dans la série linéaire, les squelettes phosphorylés sont soit avec Thme (1,1,1-(trishydroxyméthyl)éthane), soit DMCH (Diméthanolcyclohexane) ou enfin mannitol. Tous les glycoclusters sont listés *Tableau 4-7* avec les différents linkers (L1 et L2) constituant le bras espaceur ainsi que le nombre de résidus galactose terminaux.

Glycoclusters	L1	L2	Topologie	Valence
Man(proTz BuT-Gal) ₄	pro	BuT	Cœur centré	4
Man[Thme (MTz BuT-Gal) ₂] ₄	M	BuT	Cœur centré	8
Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	pro	AcNAr	Cœur centré	4
Man(proTz AcNAr-Gal) ₈	pro	AcNAr	Cœur centré	8
Man[Thme (MTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	M	AcNAr	Cœur centré	8
Thme(MTz AcNAr-Gal) ₁	M	AcNAr	Linéaire	1
(Thme-HexNH ₂ -MTz AcNAr-Gal) ₃ ³⁺	M	AcNAr	Linéaire à 3 charges positives	3
(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄	M	EG ₃	Linéaire en peigne	4
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₂	M	AcNAr	Linéaire en peigne	2
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₃	M	AcNAr	Linéaire en peigne	3
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₄	M	AcNAr	Linéaire en peigne	4
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₅	M	AcNAr	Linéaire en peigne	5
Mannitol (proTz AcNAr-Gal) ₅	pro	AcNAr	Linéaire antenne	5
Mannitol (EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₅	EG ₂	AcNAr	Linéaire antenne	5
Mannitol [Thme (MTz AcNAr-Gal) ₂] ₅	M	AcNAr	Linéaire antenne	10

Tableau 4-7 Glycoclusters étudiés

4.1.5.2. *Étude sur DDI-glycoarray*

La moyenne des intensités de fluorescence à 635nm de l'Alexa647_PA-IL pour chaque galactocluster est présentée *Figure 4-10*.

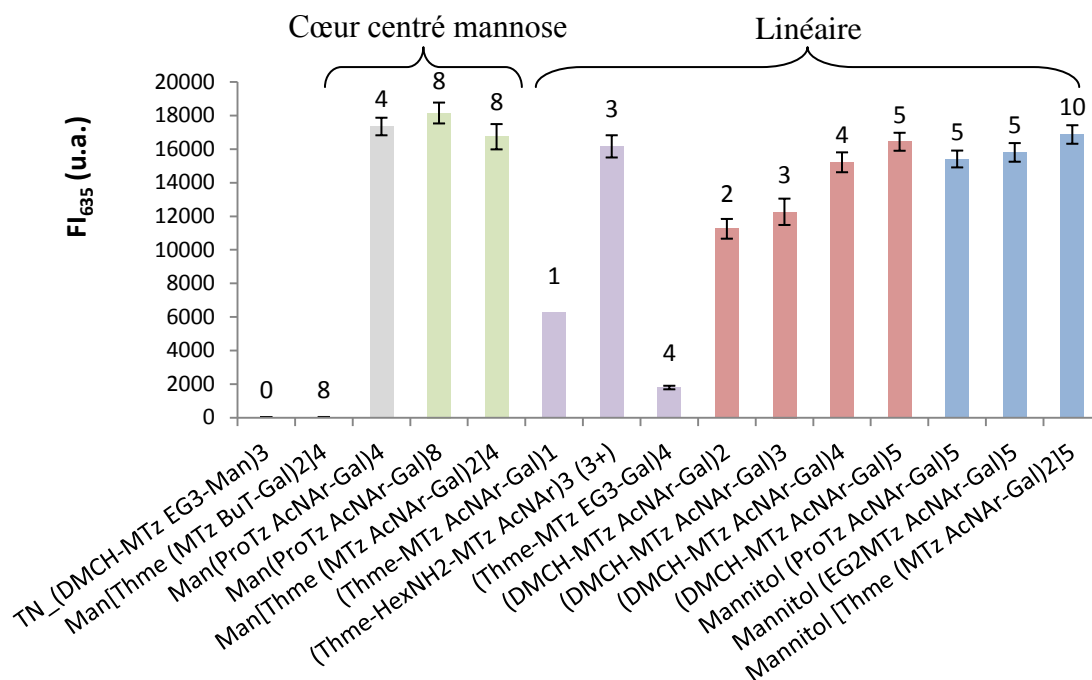


Figure 4-10 Moyenne des FI₆₃₅ de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les chiffres à l'aplomb de chaque barre correspondent au nombre de résidus galactose terminal.

Concernant la série cœur mannose, nous avons déjà remarqué que le linker aromatique thymine (L2= BuT) induisait probablement une gêne stérique lors de l'interaction avec PA-IL. Toutefois, il nous semblait intéressant de tester l'octagalactocluster Man[Thme (MTz BuT-Gal)₂]₄. L'augmentation de la valence n'entraîne aucun effet cluster car sa FI₆₃₅= 41 u.a est du même ordre de grandeur que le témoin négatif (37 u.a.). Encore une fois, les meilleures affinités sont observées pour les octagalactoclusters cœur centré mannose avec L2=AcNAr. Néanmoins, il n'y a pas exaltation de la FI₆₃₅ lorsqu'on passe de 4 résidus (17344 u.a.) à 8 résidus galactoses (18148 u.a.) pour le (proTz AcNAr). On peut même voir un signal légèrement inférieur pour le (Thme-MTz AcNAr) qui est à 16736 u.a.

Concernant la série linéaire, l'effet cluster a été étudié en faisant varier le nombre de résidus galactose de 2 à 5 : (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₂ à 5. L'affinité avec PA-IL augmente avec le nombre de résidus de 11250 u.a. à 16435 u.a. D'autre part, on rappelle que le point isoélectrique (pI) de PA-IL est de 4.94 donc à pH 7.4, cette dernière est chargée négativement. Ainsi nous avons montré *partie 4.1.2* qu'incorporer des charges positives à la structure permettait d'augmenter les interactions électrostatiques et donc d'augmenter l'affinité avec PA-IL. Le glycocluster (Thme-HexNH₂-MTz AcNAr-Gal)₃³⁺ présentant 3 charges positives a été testé. Il s'avère qu'il donne la meilleure affinité parmi tous les trigalactoclusters testés (16162 u.a.). Pour finir avec la série linéaire, le squelette phosphorylé mannitol permet de répartir les cinq bras espaceurs dans l'espace en forme de couronne et non en forme de peigne

comme avec DMCH ou Thme. Ainsi, les galactoses pourraient être plus accessibles par la lectine comme lorsqu'ils sont portés par le cœur centré mannose.

Il apparaît que quelque soit le linker, court ou long (pro ou EG₂), l'affinité n'est pas augmentée (15410 et 15803 u.a. respectivement) par rapport au pentagalactocluster DMCH correspondant (16435 u.a.).

Les valeurs d'IC₅₀ mesurées (*Tableau 4-8*) confirment les résultats de fluorescence directe. L'IC₅₀ de Man[(proTz AcNAr-Gal)₄]₂ donne la valeur la plus élevée signifiant que cette structure est la mieux reconnues par PA-IL. Néanmoins, l'affinité par résidu galactose est plus faible. L'augmentation du nombre de résidu au-delà de 4 ne semble pas mettre en évidence d'effet chélate ni d'effet cluster, ce n'est pas un paramètre clé dans l'augmentation de l'affinité avec PA-IL.

Galactoclusters	Nombre de galactose	IC ₅₀ (μM)	Efficacité relative	Efficacité relative par résidu
(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₁	1	5	1	1
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₂	2	29	5,8	2.9
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₃	3	34	6,8	2.3
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₄	4	1056	211	52.8
(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₅	5	1550	310	62.0
(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	3.5	0,7	30
(Thme-MTz AcNAr-Gal) ₁	1	14	2.8	2.8
(Thme-HexNH ₂ -MTz AcNAr-Gal) ₃ ³⁺	3	nd	/	/
Mannitol-(proTz AcNAr-Gal) ₅	5	nd	/	/
Mannitol-(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₅	5	nd	/	/
Mannitol[THME(MTz AcNAr-Gal) ₂] ₅	10	nd	/	/
Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	3700	740	185
Man[(proTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	8	6400	1280	160
Man[Thme(MTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	8	1807	361	45.1
Man[Thme(MTz BuT-Gal) ₂] ₄	8	nd	/	/

Tableau 4-8 IC₅₀ des différents galactoclusters étudiés avec leur efficacité relative par rapport au monomère (DMCH-MTz EG₃-Gal)₁ puis leur efficacité relative par résidu galactose. nd : non déterminé

En conclusion, pour toute cette étude de l'influence du nombre de résidus terminaux sur l'affinité sucre/lectine, doubler la valence de 4 à 8 résidus ne nous a pas permis de doubler la fluorescence et encore moins d'obtenir un effet cluster. L'augmentation du nombre de résidu augmente linéairement l'intensité de fluorescence mais il n'y a pas d'exaltation exponentielle comme suggéré dans un effet cluster. Il semblerait que l'augmentation de la valence au-delà de 4 ne soit pas un paramètre clé dans l'augmentation de l'affinité avec PA-IL. Il serait tout de même intéressant de synthétiser un octagalactocluster à cœur centré mannose présentant 3 charges positives afin d'observer l'augmentation de l'affinité vis-à-vis

de PA-IL. Dans tous les cas, des mesures d'IC₅₀ et de K_d seront nécessaires pour ces structures intéressantes afin de confirmer nos hypothèses.

4.1.6. Conclusion générale sur PA-IL

En conclusion générale, cette étude nous a permis de sélectionner deux galactoclusters intéressants : **Man(EG₄MTz AcNAr-Gal)₄** et **Man(proTz AcNAr-Gal)₈** qui présentent les meilleures affinités pour PA-IL. Leur affinité par résidu est de l'ordre de 18. D'autre part, nous avons pu noter que nos galactoclusters ne sont pas capables de se lier à plusieurs sites de fixation d'une lectine PA-IL. Aucun effet chélate n'est donc observé. L'augmentation de l'affinité serait probablement due à l'augmentation de la concentration locale en galactose pour les galactoclusters linéaires, tandis que pour les cœurs centrés hexoses, elle serait due à des interactions supplémentaires ou à la stabilisation stérique, empêchant l'approche de galactose libre. Des travaux sont en cours pour synthétiser d'autres galactoclusters en travaillant sur les paramètres qui nous semblent importants (longueur et flexibilité du bras espaceur) dans l'espoir de lier deux sites de fixation d'une même lectine. De plus, les deux galactoclusters sélectionnés seront synthétisés sans la séquence d'ADN à une plus grande échelle afin de réaliser des études biophysiques et biologiques.

4.2. Etude d'affinité sur PA-IIL

Nous avons vu dans le *Chapitre 1* que PA-IIL, lectine tétravalente spécifique du fucose, présente une structure particulière où les quatre sites de liaison au fucose sont disposés de part et d'autre de la sphère. De même que pour PA-IL, l'affinité pour PA-IIL dépend de la topologie du glycocluster, de la nature et du nombre de linker constituant les bras espaceurs. Ainsi, différents fucoclusters multivalents ont été synthétisés afin de déterminer les paramètres physiques et thermodynamiques intra et intermoléculaires favorisant la meilleure insertion des résidus fucose dans les sites de liaisons de PA-IIL.

Pour cette étude sur DDI-glycoarray, tous les glycoclusters sont portés par une « étiquette ADN » (Zip code) afin d'être immobilisés par hybridation de l'ADN dirigée (par DDI). Un fluorophore Cy3 a été incorporé à chaque séquence ADN afin de contrôler l'hybridation par fluorescence (notée FI₅₃₂). La lecture de l'intensité de fluorescence à 635 nm du fluorophore Alexa647 lié à la lectine PA-IIL (notée FI₆₃₅) permet d'étudier l'interaction sucre/lectine. Les fucoclusters présentent la même structure générale que sur la *Figure 4-1*.

4.2.1. Influence de la topologie sur l'interaction

4.2.1.1. Glycoclusters étudiés

Le témoin négatif (DMCH-proTz EG₃-Gal)₃ présente 3 galactoses en résidus terminaux avec le linker linéaire dimethanolcyclohexane (DMCH). Le galactose n'étant pas reconnu par PA-IIL, il ne devrait pas y avoir d'interaction entre ce dernier et la lectine donc nous ne devrions pas observer de signal de fluorescence pour ce glycocluster.

Puis trois tétrafucoclusters linéaires, un antenné, trois à cœur centré hexose et trois à cœur centré pentose ont été testés. Les linéaires sont construits avec le coeur DMCH et présentent 3 ou 4 résidus fucoses terminaux : (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₃ ou ₄ et pour l'un des trifucoclusters, (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁₁₀₁, le dernier bras espaceur est éloigné des deux premiers afin de voir l'influence de l'éloignement spatial des résidus fucoses sur l'interaction avec PA-IIL. Ils correspondent aux structures « a, b et c » sur la *Figure 4-1*. D'autre part, l'effet des trois cœurs centrés hexose (mannose, galactose et glucose) a été comparé aux trois cœurs centrés pentose (arabinose, xylose et ribose) afin d'observer l'influence de la direction des hydroxyles, c'est à dire la configuration des bras espaceurs dans l'espace. Ils correspondent aux structures « d et e » sur la *Figure 4-1*. Tous sont listés ci-dessous *Tableau 4-9*.

Glycoclusters	L1	L2	Topologie	Valence
TN_ (DMCH-proTz EG ₃ -Gal) ₃	pro	EG ₃	/	0
(Pe-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	Linéaire antenné	4
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₁₁₀₁	M	EG ₃	Linéaire en peigne	3
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₃	M	EG ₃	Linéaire en peigne	3
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	M	EG ₃	Linéaire en peigne	4
Glc(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	cœur centré hexose	4
Gal(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	cœur centré hexose	4
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	cœur centré hexose	4
Ara(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	pro	EG ₃	cœur centré pentose	3
Ribo(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	pro	EG ₃	cœur centré pentose	3
Xylo(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	pro	EG ₃	cœur centré pentose	3

Tableau 4-9 Glycoclusters étudiés

4.2.1.2. Etude sur DDI-glycoarray

Après contrôle de la bonne hybridation des différents fucoclusters sur la puce par lecture de la fluorescence à 532nm, la lectine marquée PA-IIL-Alexa647 a été incubée pendant 3h à 37°C. Après lavages, la lecture de fluorescence du fluorophore Alexa-647 à 635nm permet de tracer, *Figure 4-11*, la moyenne des intensités de fluorescence en fonction des fucoclusters étudiés et ainsi obtenir les informations relatives à l'affinité de liaison pour chaque glycocluster.

La faible fluorescence observée pour le témoin négatif trigalactose (271 u.a.) démontre l'absence d'adsorption non spécifique de PA-IIL à la surface du glycoarray.

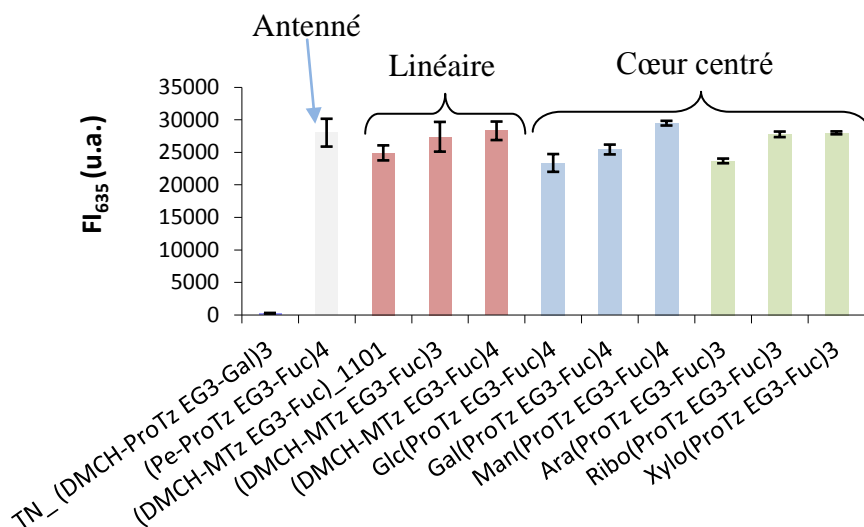


Figure 4-11 Moyenne des FI₆₃₅ de l'Alexa-647_PA-IIL pour les fucoclusters de topologie différente : linéaire, antenné, à cœur centré hexose ou pentose

Il apparaît que le fucocluster antenné présente une affinité significative pour PA-IIL car sa FI₆₃₅ = 28041 u.a. Toutefois les différences de fluorescence sont faibles et la structure la mieux reconnue est le cœur centré hexose Man(proTz EG₃-Fuc)₄ avec une FI₆₃₅ de 29504 u.a. Le Tableau 4-10 nous indique que l'IC₅₀ de l'antenné est 1.36 fois meilleur que celui du cœur centré. Pourtant, grâce aux mesures de K_d , on a la confirmation que le cœur centré mannose est 1.14 fois mieux reconnu par PA-IIL. Encore une fois, lorsque les affinités de deux structures sont proches, la détermination de l'IC₅₀ doit être comparée à une autre analyse quantitative à cause de l'échelle logarithmique.

Fucoclusters	Nombre de fucose	IC ₅₀ (μM)	Efficacité relative	Efficacité relative par résidu	K_d (nM)
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₁	1	0.2	1	1	nd
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	3	15	5	nd
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	5	25	6.3	nd
(Pe-proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	15	75	18.8	175
Glc(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	2	10	2.5	nd
Gal(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	1	5	1.3	nd
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	11	55	13.8	153

Tableau 4-10 K_d et IC₅₀ des différents fucoclusters étudiés avec leur efficacité relative par rapport au monomère (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁ puis leur efficacité relative par résidu fucose. nd : non déterminé

Les autres cœurs centrés hexoses (galactose et glucose), présentent respectivement une FI₆₃₅ de 25453 et 23387 u.a et leurs efficacités relatives par résidu sont de 2.5 et 1.3 contre 13.8 pour le cœur mannose. Comme pour PA-IL, il semblerait que la topologie

engendrée par le cœur centré mannose permette d'augmenter l'affinité pour la lectine. La configuration spatiale du glycocluster induite par le cœur mannose favoriserait les liaisons hydrogènes entre les hydroxyles du résidu terminal (fucose dans ce cas) et les acides carboxyliques des acides aminés présents dans le site de reconnaissance de PA-III. Le bras espaceur lié en alpha du carbone 2 (au dessus du cycle, voir *Figure 4-4*) semblerait favorable à l'interaction avec la lectine PA-III : mannose > glucose + galactose.

Pour les cœurs centrés pentoses (arabinose, ribose et xylose), ils présentent respectivement des FI_{635} de 23700, 27789 et 28017 u.a. Dans cette série pentose, et contrairement à la série hexose ci dessus, le bras espaceur lié en alpha du carbone 2 (au dessus du cycle) semblerait défavorable : arabinose < xylose + ribose. Il serait intéressant de mesurer leurs IC_{50} afin de confirmer nos hypothèses suivant l'étude des fluorescences directes.

Concernant la série linéaire, il apparait que l'espace entre les bras ne soit pas un avantage car la FI_{635} du trifucocluster (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁₁₀₁ est de 24937 u.a. tandis que celle du trifucocluster (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₃ est de 27412 u.a. Toutefois, la série linéaire semble être une topologie intéressante car la FI_{635} du tétrafucocluster (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₄ est de 28333 u.a., valeur proche du cœur centré mannose Man(proTz EG₃-Fuc)₄. Comme pour l'antenné, sachant que les fluorescences sont proches, il serait nécessaire de mesurer les K_d afin de confirmer le classement déterminé par les mesures de fluorescence et d' IC_{50} .

De cette étude de l'influence de la topologie sur l'affinité sucre/lectine, deux structures retiennent particulièrement notre attention : il s'agit des tétrafucoclusters linéaire (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₄ et cœur centré Man(proTz EG₃-Fuc)₄. Encore une fois, la topologie proposée par le cœur mannose avec cette inversion de configuration de l'hydroxyle, lié au carbone 2 du cœur, induirait une augmentation de l'affinité. Néanmoins, la topologie linéaire en peigne permettant de présenter localement les résidus fucoses d'un côté du squelette phosphorylé induirait une forte affinité pour PA-III. Ces configurations spatiales ne présentent pas de gêne stérique et favorisent probablement les liaisons hydrogènes entre les hydroxyles du fucose et les acides carboxyliques des acides aminés présents dans le site de liaison.

4.2.1. Influence des linkers L1 et L2

4.2.1.1. Glycoclusters étudiés

Dans cette partie, un tétrafucocluster linéaire (*Figure 4-1a*), six à cœur centré hexose (*Figure 4-1d*) et six à cœur centré pentose (*Figure 4-1e*) ont été testés.

Le linéaire est construit avec le squelette phosphorylé DMCH : (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₄. Pour les cœurs centrés, ils sont à cœur mannose, glucose ou galactose avec chacun des linkers aliphatiques différents. Puis l'effet des trois cœurs centrés hexoses (cycle à 6 carbones) a été comparé aux trois cœurs centrés pentoses (cycle à 5 carbones) : arabinose, xylose et ribose avec des bras différents court ou long (propyle et diéthylène glycol méthyle respectivement). Tous sont listés ci-dessous *Tableau 4-11*.

Glycoclusters	L1	L2	Topologie	Valence
TN_ (DMCH-proTz EG ₃ -Gal) ₃	pro	EG ₃	/	0
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	M	EG ₃	linéaire	4
Glc(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	cœur centré hexose	4
Gal(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	cœur centré hexose	4
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	cœur centré hexose	4
Glc(hexTz M-Fuc) ₄	hex	M	cœur centré hexose	4
Gal(hexTz M-Fuc) ₄	hex	M	cœur centré hexose	4
Man(hexTz M-Fuc) ₄	hex	M	cœur centré hexose	4
Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	EG ₂	EG ₃	cœur centré hexose	4
Man(EG ₄ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	EG ₄	EG ₃	cœur centré hexose	4
Ara(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	pro	EG ₃	cœur centré pentose	3
Xylo(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	pro	EG ₃	cœur centré pentose	3
Ribo(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	pro	EG ₃	cœur centré pentose	3
Ara(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	EG ₂	EG ₃	cœur centré pentose	3
Xylo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	EG ₂	EG ₃	cœur centré pentose	3
Ribo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	EG ₂	EG ₃	cœur centré pentose	3

Tableau 4-11 Glycoclusters étudiés

4.2.1.2. Etude sur DDI-glycoarray

La lecture de fluorescence du fluorophore Alexa-647 à 635nm a permis de tracer, *Figure 4-12*, la moyenne des intensités de fluorescence en fonction des fucoclusters étudiés. Le *Tableau 4-12* résume les K_d et IC_{50} mesurés à ce jour ainsi que les efficacités relatives par rapport au monovalent (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁ et relatives par résidu.

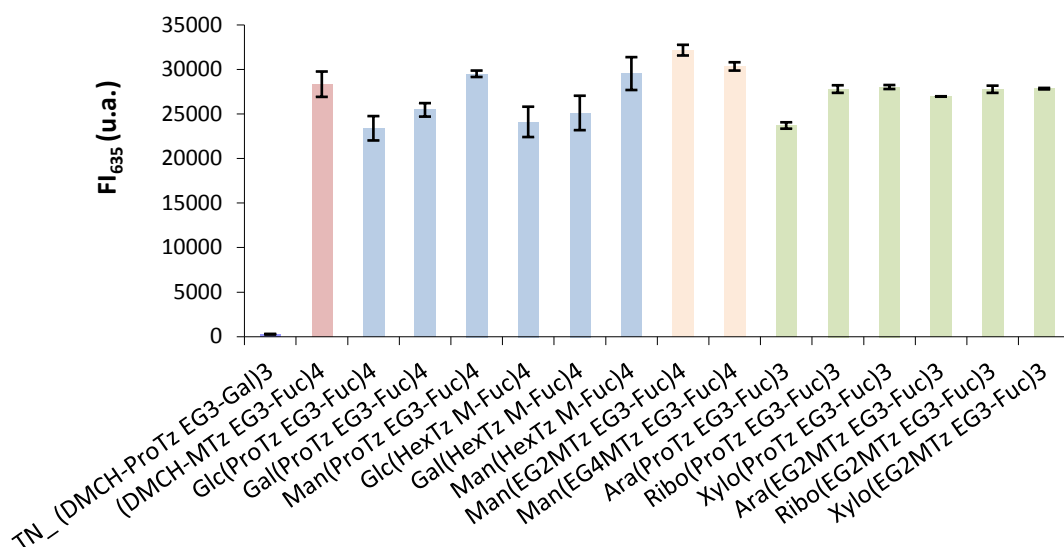


Figure 4-12 Moyenne des FI_{635} de l'Alexa-647_PA-IIL pour les fucoclusters possédant des linkers différents

En choisissant le linéaire (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₄ à 28333 u.a. comme témoin positif, les cœurs hexoses centrés galactose et glucose semblent moins affins quelque soit le linker bras long proTz EG₃ ou bras court hexTz M avec une moyenne de fluorescence autour de 24500 u.a. Par contre les cœurs hexoses centrés mannoses semblent bien reconnus avec une FI_{635} de 29526 u.a. pour Man(hexTz M-Fuc)₄ et de 29504 u.a pour Man(proTz EG₃-Fuc)₄. Toutefois les valeurs d'IC₅₀ indiquent que le bras long (proTz EG₃) présente une efficacité relative par résidu de 13.8 contre 8.8 pour le bras court (hexTz M). Il serait nécessaire de déterminer le K_d de ce dernier afin de le comparer au 153 nM, K_d du bras long Man(proTz EG₃-Fuc)₄.

De même que pour PA-IL, il semblerait que la flexibilité et la longueur du bras aient une influence car l'augmentation de la longueur L1 d'un propyl (Pro) à un diéthylène glycol (EG₂) entre Man(ProTz EG₃-Fuc)₄ et Man(EG₂MTz EG₃-Fuc)₄ a permis d'augmenter la fluorescence de 29504 u.a. à 32155 u.a. De même, son efficacité relative par résidu est 1.27 fois meilleure et son K_d est 1.4 fois plus faible. Cette conclusion a déjà été rapportée pour un glycocluster divalent présentant un cœur rigide et des extrémités de bras flexibles a été 272 fois mieux reconnu par PA-IIL que le monovalent (Pertici and Pieters 2012). Toutefois il semble y avoir une longueur optimum car la FI_{635} de Man(EG₄MTz EG₃-Fuc)₄ est diminuée à 30330 u.a. Il serait donc intéressant de mesurer l'IC₅₀ et le K_d de Man(EG₄MTz EG₃-Gal)₄ afin de vérifier cette conclusion tirée de la lecture de fluorescence directe.

Fucoclusters	Nombre de fucose	IC ₅₀ (μM)	Efficacité relative	Efficacité relative par résidu	K _d (nM)
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₁	1	0.2	1	1	nd
Glc(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	2	10	2.5	nd
Gal(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	1	5	1.3	nd
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	11	55	13.8	153
Glc(hexTz M-Fuc) ₄	4	nd	/	/	nd
Gal(hexTz M-Fuc) ₄	4	nd	/	/	nd
Man(hexTz M-Fuc) ₄	4	7	35	8.8	
Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	14	70	17.5	109
Ara(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	nd	/	/	nd
Ribo(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	nd	/	/	nd
Xylo(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	nd	/	/	nd
Ara(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	nd	/	/	156
Ribo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	nd	/	/	93
Xylo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	nd	/	/	nd

Tableau 4-12 K_d et IC₅₀ des différents fucoclusters étudiés avec leur efficacité relative par rapport au monomère (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁ puis leur efficacité relative par résidu fucose. nd : non déterminé

Concernant les cœurs pentoses, il semble n'y avoir aucune influence de la nature du linker. En effet, pour les cœurs arabinose, xylose et ribose, entre les linkers longs (EG₂MTz EG₃) ou courts (ProTz EG₃), la FI₆₃₅ varie peu entre 18892 et 22806 u.a. Néanmoins mesurer les IC₅₀ et les K_d apporterait de nouvelles informations car pour l'instant, les K_d de l'Ara(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃ et Ribo(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃ sont respectivement de 156 nM et 93 nM. Ainsi la structure Ara(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃ serait aussi bien reconnue que la seconde meilleure structure trouvée à cet instant : Man(proTz EG₃-Fuc)₄. De plus, ce résultat nous indique que la structure la mieux reconnue serait le Ribo(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃ et non le Man(EG₂MTz EG₃-Fuc)₄. Cette observation est étonnante car cette structure présente seulement 3 résidus terminaux. L'étude de la valence semble donc importante dans ce cas. D'autre part, il semblerait que la topologie induite par le cœur ribose (5 carbones), comme celle avec le cœur mannose (6 carbones), présente les bras espaceurs flexibles de manière optimale pour les sites de reconnaissance de PA-IIL.

De cette étude de l'effet du linker sur l'affinité sucre/lectine, deux structures retiennent particulièrement notre attention quant à leur haute affinité vis-à-vis de PA-IIL. Il s'agit du tétrafucocluster Man(EG₂MTz EG₃-Fuc)₄ et étonnamment le trifucocluster Ribo(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃ qui présentent une longueur et flexibilité optimale des linkers L1 et L2 grâce aux polyéthylène glycol. La topologie engendrée par les cœurs mannose et ribose

induirait des interactions supplémentaires ou une stabilisation stérique. Nous avons également observé qu'en plus de la topologie et de l'influence des linkers, le nombre de résidus terminaux avait probablement une grande importance. Ainsi, de nouveaux glycoclusters présentant différentes valences ont été étudiés.

4.2.2. Influence du nombre de résidus fucose

4.2.2.1. *Glycoclusters étudiés*

La valence des fucoclusters varie de 1 à 10 et ils présentent des topologies différentes : linéaire en peigne (DMCH ou Thme) ou antenné (Pe) ou bien à cœur centré mannose car nous venons de voir que cette topologie semblait intéressante. Tous sont listés ci-dessous *Tableau 4-13*.

Glycoclusters	L1	L2	Topologie	Valence
TN_ (DMCH-proTz EG ₃ -Gal) ₃	pro	EG ₃	/	0
(Thme-MTz EG ₃ -Fuc) ₁	M	EG ₃	Linéaire en peigne	1
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₂	M	EG ₃	Linéaire en peigne	2
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₃	M	EG ₃	Linéaire en peigne	3
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	M	EG ₃	Linéaire en peigne	4
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₅	M	EG ₃	Linéaire en peigne	5
(Thme-HexNH ₂ -MTz EG ₃ -Fuc) ₃ ³⁺	M	EG ₃	Linéaire à 3 charges positives	3
(Pe-proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	Linéaire antenné	4
Mannitol(proTz EG ₃ -Fuc) ₅	pro	EG ₃	Linéaire antenné	5
Mannitol(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₅	EG ₂	EG ₃	Linéaire antenné	5
Mannitol[Thme(MTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₅	M	EG ₃	Linéaire antenné	10
(hexTz M-Fuc) ₁	hex	M	Linéaire en peigne	1
Man(hexTz M-Fuc) ₄	hex	M	Cœur centré hexose	4
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	pro	EG ₃	Cœur centré hexose	4
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₈	pro	EG ₃	Cœur centré hexose	8

Tableau 4-13 Glycoclusters étudiés

4.2.2.2. *Etude sur DDI-glycoarray*

La lecture de fluorescence du fluorophore Alexa-647 à 635nm nous a permis de tracer, *Figure 4-13*, la moyenne des intensités de fluorescence en fonction des fucoclusters étudiés. Le *Tableau 4-14* résume les valeurs des K_d et IC_{50} mesurées à ce jour ainsi que les efficacités relatives par rapport au monovalent (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁ et relatives par résidu.

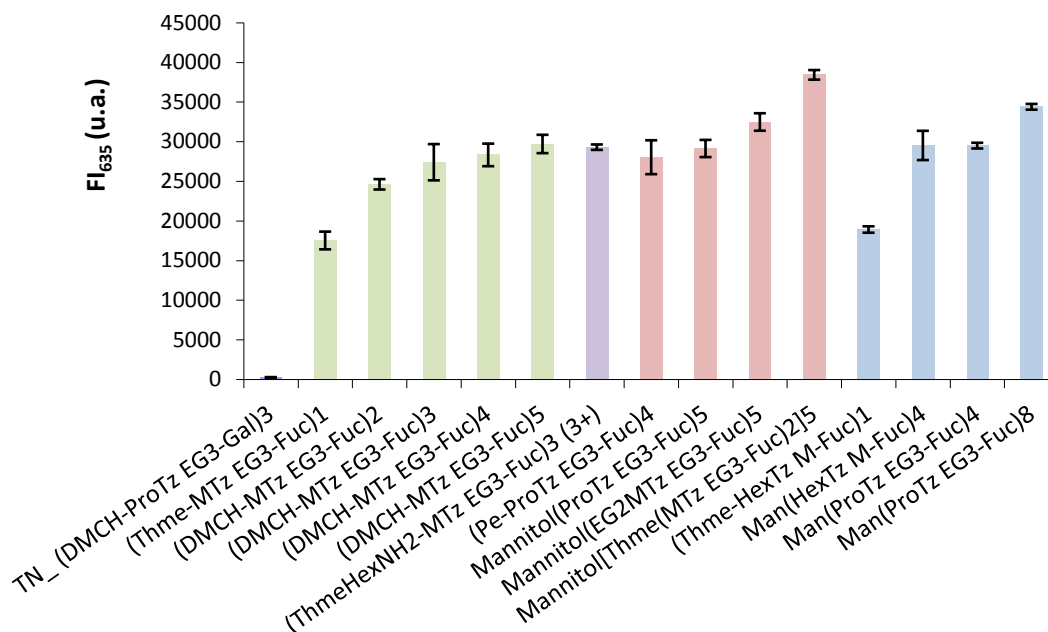


Figure 4-13 Moyenne des FI₆₃₅ de l'Alexa-647_PA-IIL pour les fucoclusters présentant différentes valences

Concernant la **série linéaire**, l'effet cluster a été étudié en faisant varier le nombre de résidu fucose de 2 à 5 : (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₂ à ₅ et comparé avec le monovalent (Thme-MTz EG₃-Fuc)₁. La FI₆₃₅ augmente avec le nombre de résidu de 17538 u.a. pour le monovalent à 29713 u.a. pour le pentavalent. Il est à noter que doubler la valence permet d'augmenter l'affinité pour PA-IIL d'un facteur 1.18 seulement. En considérant les valeurs d'IC₅₀, on aboutit à une augmentation de l'efficacité relative par résidu d'1.26. L'augmentation de l'affinité serait probablement due à l'augmentation de la concentration locale en fucose et non due à un effet chélate.

D'autre part, pour cette structure linéaire en peigne DMCH, la modification du linker L1 en ajoutant **3 charges positives** au trifucocluster (Thme-HexNH₂-MTz AcNAr-Gal)₃³⁺ a permis d'augmenter son affinité de 1.14 pour PA-IIL par rapport au trifucocluster neutre (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₃. On rappelle que le point isoélectrique (pI) de PA-IIL est 3.88 donc à pH 7.4, cette dernière est chargée négativement. Ainsi, comme pour PA-IL, les trois charges positives permettent d'augmenter les interactions électrostatiques et donc d'augmenter l'affinité. Toutefois il semblerait que l'ajout de charges positives n'apporte pas autant que l'augmentation de la valence.

Fucoclusters	Nombre de fucose	IC ₅₀ (μM)	Efficacité relative	Efficacité relative par résidu	K _d (nM)
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₁	1	0.2	1	1	nd
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₂	2	2	10	5	nd
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	3	15	5	nd
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	5	25	6.3	nd
(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	8	40	8	nd
(Thme-HexNH ₂ -MTz EG ₃ -Fuc) ₃ ³⁺	3	nd	/	/	148
Mannitol(proTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	nd	/	/	nd
Mannitol(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	nd	/	/	nd
Mannitol[Thme(MTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₅	10	nd	/	/	84
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	11	55	13.8	153
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₈	8	16	80	10	96

Tableau 4-14 K_d et IC₅₀ des différents fucoclusters étudiés avec leur efficacité relative par rapport au monomère (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁ puis leur efficacité relative par résidu fucose. nd : non déterminé

Nous avons vu *partie 4.1.3* que la **topologie antennée** grâce au squelette phosphorylé Pe semblait bien reconnue par PA-III. Nous avons donc testé l'augmentation de la valence pour la topologie linéaire antennée grâce au squelette phosphorylé mannitol qui permet de répartir les 5 résidus terminaux de part et d'autre du squelette. Il apparaît que le bras long avec L1= EG₂ soit mieux reconnu que le bras court avec L1= Pro. En effet, l'affinité est respectivement diminuée de 32488 à 29141 u.a. De plus, par rapport au penta-fucocluster linéaire en peigne (FI₆₃₅= 29713 u.a.) il apparaît que le bras long présente un léger avantage. Néanmoins, il serait important de déterminer les IC₅₀ et K_d respectif afin de poursuivre la discussion. D'autre part, de passer de 5 à 10 résidus fucose améliore l'affinité car la FI₆₃₅ est augmentée d'un facteur 1.32. Ce paramètre ne semble toutefois pas primordial comme précisé ci-dessus : l'augmentation de l'affinité serait probablement due à l'augmentation de la concentration locale en fucose et non due à un effet chélate.

Concernant la **série cœur mannose**, malgré le doublement de la valence de 4 à 8 fucoses : Man(proTz EG₃-Fuc₂)₄, la FI₆₃₅ a été augmentée d'un facteur 1.17 par rapport au tétravalent correspondant (29504 u.a. pour 34401 u.a.). Même conclusion que ci-dessus, il n'y a pas d'effet chélate et encore moins d'effet cluster. L'augmentation serait due à des interactions supplémentaires ou à la stabilisation stérique, empêchant l'approche de fucoses libres. Les mesures de K_d confirment cette hypothèse car celui de l'octavalent est 1.6 fois plus faible que le tétravalent. Pour les IC₅₀, les valeurs sont du même ordre de grandeur et comme déjà précisé, l'échelle logarithmique rend critique leurs déterminations.

En conclusion dans cette étude de l'influence du nombre de résidus terminaux sur l'affinité sucre/lectine, doubler la valence de 4 à 8 résidus ou de 5 à 10 résidus ne nous a pas

permis de doubler la fluorescence et encore moins d'obtenir un effet cluster. L'augmentation du nombre de résidu ne semble pas être un paramètre clé dans l'augmentation de l'affinité vis-à-vis de PA-IIL. Il serait tout de même intéressant de synthétiser un octagalactocuster à cœur centré ribose à bras long présentant 3 charges positives afin d'observer l'augmentation de l'affinité vis-à-vis de PA-IIL. De plus, déterminer et réitérer des mesures d'IC₅₀ et de K_d pour les structures intéressantes telles que Man(EG₄MTz EG₃-Fuc)₄ et Xylo(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃ seront nécessaires afin de confirmer nos hypothèses.

4.2.3. Conclusion sur l'étude d'affinité avec PA-IIL

Cette étude sur PA-IIL a permis de sélectionner deux tétra-fucomimétiques : **Ribo(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃** et **Man(EG₂MTz EG₃-Fuc)₄** présentant les meilleures affinités pour PA-IIL. Cette dernière présente une efficacité relative par résidu de l'ordre de 18. D'autre part, nous avons pu noter que nos fucoclusters ne sont pas capables de se lier à plusieurs sites de fixation d'une lectine PA-IIL. Aucun effet chélate n'a été observé. L'augmentation de l'affinité serait probablement due à l'augmentation de la concentration locale en fucose pour les fucomimétiques linéaires, tandis que pour les fucomimétiques cœur centré hexose, elle serait due à des interactions supplémentaires ou à la stabilisation stérique, empêchant l'approche de fucoses libres. Résultats publiés (Gerland et al. 2012a)

Des travaux sont en cours pour synthétiser d'autres fucomimétiques possédant plus de liaisons dans l'espoir de lier deux sites de fixation d'une lectine PA-IIL et ainsi obtenir un effet chélate. De plus, les deux fucoclusters sélectionnés seront synthétisés sans la séquence d'ADN à une plus grande échelle afin de réaliser des études biophysiques et biologiques.

4.3. Etude d'un hétéroglycocluster dirigé contre PA-IL et PA-IIL

4.3.1.1. *Glycoclusters étudiés*

Afin de cibler simultanément deux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : PA-IL et PA-IIL, un hétéroglycocluster grappe a été synthétisé : Grappe-[Man(ProTz EG₃-Gal)₄]-[Man(ProTz EG₃-Fuc)₄] appelé plus simplement **Fuc₄Gal₄** par la suite. Ce dernier présente 4 galactoses et 4 fucoses en résidus terminaux et a été comparé à la fluorescence des homoglycoclusters correspondant : Man(ProTz EG₃-Gal)₄ noté **Gal₄** et Man(ProTz EG₃-Fuc)₄ noté **Fuc₄**. Ils sont listés ci-dessous *Tableau 4-15*.

Glycoclusters	L1	L2	Nombre de galactose	Nombre de fucose
Gal₄ = Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄	Pro	EG ₃	4	0
Fuc₄ = Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	Pro	EG ₃	0	4
Fuc₄Gal₄ = Grappe-[Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄]-[Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄]	Pro	EG ₃	4	4

Tableau 4-15 Glycoclusters étudiés

4.3.1.2. Etude sur DDI-glycoarray

Les trois glycoclusters ont été immobilisés par DDI sur une lame microstructurée à puits ronds. (Chaque puit correspond à un spot). Après contrôle de la bonne hybridation des différents glycoclusters sur la puce par lecture de la fluorescence à 532nm, la lectine marquée PA-IL a été incubée dans les 3 premières lignes de la puce, PA-III dans les 3 lignes suivantes et le mélange des deux lectines dans les 3 derniers puits pendant 3h à 37°C. Il y a quatre répétitions de chaque expérience sur une même ligne. Après lavages, l'intensité de fluorescence, lue à 635nm (FI₆₃₅), apporte les informations relatives à l'affinité de liaison pour chaque glycocluster.

L'image du scan de la lame aux deux longueurs d'onde (532 et 635nm) correspondant aux deux fluorophores (Cy3 et Alexa647) est présentée ci-dessous *Figure 4-14*. Puis, la *Figure 4-15* présente la lecture de fluorescence à 635nm correspondant à l'interaction lectine/glycocluster

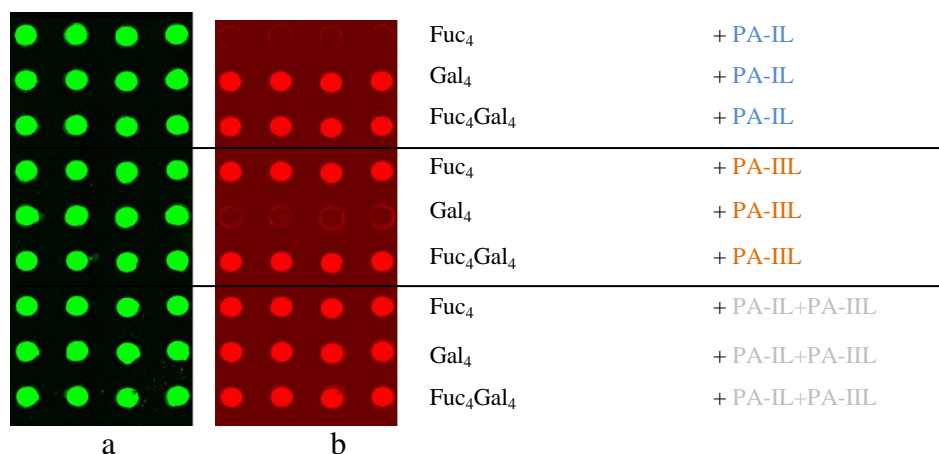


Figure 4-14 Photo du scan de la lame (a) à 532nm (du Cy3) et (b) à 635nm (de l'Alexa Fluor 647). Chaque expérience (un glycocluster réagissant avec une lectine) est répétée 4 fois correspondant aux quatre puits de chaque ligne.

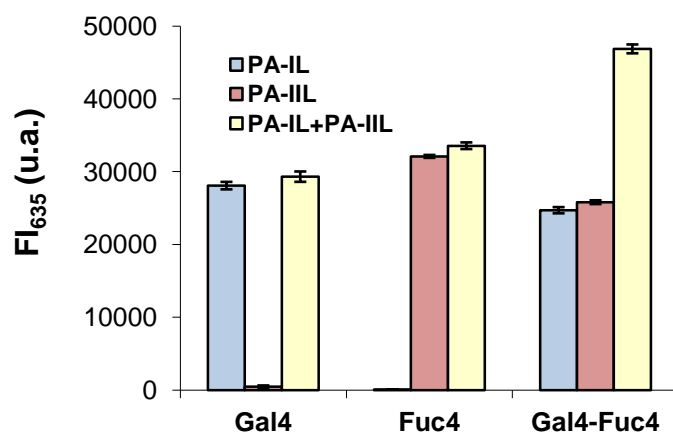


Figure 4-15 Moyenne des FI_{635} des lectines marquées en fonction du glycocluster testé. Les lectines PA-IL ou PA-IIL ou le mélange des deux sont incubées avec **Gal₄** ou **Fuc₄** ou **Fuc₄Gal₄**. La déviation standard est calculée à partir des 4 répétitions

L'intensité du signal de fluorescence de l'incubation de PA-IL avec **Gal₄** et PA-IIL avec **Fuc₄** est d'environ 30000 u.a. tandis qu'il est au niveau du bruit de fond (inférieur à 500 u.a.) pour l'incubation de PA-IIL avec **Gal₄** et PA-IL avec **Fuc₄** (Figure 4-15). Ces résultats ont confirmé la grande spécificité de chaque lectine pour son ligand ainsi que le faible niveau d'interactions non spécifiques ou d'adsorption des protéines sur la surface de la puce. Dans une autre expérience, l'incubation d'un mélange équimolaire de PA-IL et PA-IIL avec soit le **Gal₄**, soit le **Fuc₄** a donné une augmentation non significative de l'intensité du signal (~ 4% - barres en jaune) par rapport aux signaux observés lors de l'incubation avec une seule lectine (PA-IL ou PA-IIL). Ces résultats ont démontré que la présence de la lectine spécifique n'a pas induit une adsorption non spécifique importante de l'autre lectine.

PA-IL ou PA-IIL ont ensuite été incubées séparément avec l'hétéroglycocluster **Fuc₄Gal₄**, les intensités du signal de fluorescence sont à peu près de 25 000 u.a. correspondant à une légère baisse (12% et 20%) par rapport à l'incubation de chaque lectine avec les homoglycoclusters spécifiques. Ces résultats suggèrent que la présence du glycocluster non spécifique dans l'hétéroglycocluster **Fuc₄Gal₄** induirait un léger encombrement stérique pour les lectines malgré le linker EG₄ (tétraéthylèneglycol) séparant les groupes de glycoclusters entre eux. Puis l'incubation du mélange équimolaire de PA-IL et PA-IIL avec l'hétéroglycocluster a donné un signal de fluorescence de 47000 u.a. ce qui est inférieur de 7% à la somme des signaux de fluorescence pour les lectines seules. Ces données suggèrent que les deux lectines interagissent avec l'hétéroglycocluster et la présence d'une lectine a un effet limité sur l'autre.

Dans une autre expérience nous avons déterminé sur glycoarray les valeurs IC_{50} de chaque glycocluster. Ainsi, **Gal₄** et **Fuc₄Gal₄** ont été incubés avec PA-IL et un gradient de

concentration en inhibiteur lactose d'une part, d'autre part, **Fuc₄** et **Fuc₄Gal₄** ont été incubés avec PA-III et un gradient de concentration en inhibiteur L-fucose. On rappelle que l'IC₅₀ correspond à la concentration en inhibiteur pour inhiber à 50% l'interaction sucre-lectine. Par conséquent, une valeur élevée correspond à une interaction forte. Les valeurs IC₅₀ calculées sont présentées *Tableau 4-16*. Ces résultats montrent une légère diminution du taux de lectines se liant à l'hétéroglycocluster par rapport aux homoglycoclusters. La même tendance a déjà été observée par Deguise et al. (Deguise et al. 2007) avec un hétéro-tétragalactos-tétrafucose.

Glycoclusters	IC ₅₀ (µM)	
	PA-IL+lactose	PA-III+L-fucose
Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄	29	/
Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	/	11
Grappe-[Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄]-[Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄]	15	6

Tableau 4-16 IC₅₀ pour les inhibiteurs : lactose et L-fucose, pour les 3 glycoclusters vis-à-vis de PA-IL ou PA-III ou le mélange (PA-IL+PA-III)

En conclusion, la comparaison des propriétés de liaison vis-à-vis de PA-IL et PA-III a été étudiée par glycoarray avec un hétéroglycocluster et ses homoglycoclusters correspondants. Ainsi, l'hétéroglycocluster interagit simultanément avec les deux lectines solubles de *Pseudomonas aeruginosa* avec toutefois une affinité légèrement plus faible comparée aux homoglycoclusters. Ces résultats sont une preuve générale du concept de la double interaction d'un sucre avec les deux lectines bactériennes solubles de *Pseudomonas aeruginosa*. Résultats publiés (Gerland et al. 2012b).

4.4. Etude d'affinité sur FliD

La lectine FliD a été déterminée comme étant un facteur de virulence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Elle semble donc une cible pertinente pour l'étude d'un traitement contre l'infection bactérienne. Nous avons vu dans le *Chapitre 1* que FliD est une lectine flagellaire spécifique des Lewis^x et dérivés (*Figure 4-16*). La structure tridimensionnelle de cette lectine n'est pas encore répertoriée dans la base de données des protéines. Néanmoins, nous supposons que comme PA-IL et PA-III, l'affinité pour FliD dépend de la topologie du glycocluster, de la nature des linkers et de la valence. Aussi, nous avons choisi de tester notre bibliothèque de galactoclusters multivalents sur cette lectine. En effet, le trisaccharide Lewis^x

présente un galactose terminal. Nous cherchons à déterminer les paramètres favorisant l'interaction avec FliD.

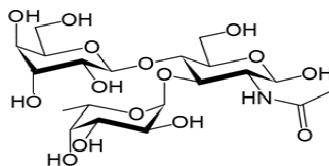


Figure 4-16 Représentation du trisaccharide Lewis^x : α -L-Fuc-(1→3)-[β -D-Gal-(1→4)]-D-GlcNAc

Pour cette étude sur DDI-glycoarray, tous les glycoclusters sont portés par une « étiquette ADN » (Zip code) afin d'être immobilisés par hybridation de l'ADN dirigée (par DDI). Un fluorophore Cy3 a été incorporé à chaque séquence ADN afin de contrôler l'hybridation par fluorescence (notée FI₅₃₂). La lecture de l'intensité de fluorescence à 635 nm du fluorophore Alexa647 lié à la lectine FliD (notée FI₆₃₅) permet d'étudier l'interaction sucre/lectine. La représentation de la structure générale des galactoclusters se trouve *Figure 4-1*.

4.4.1.1. Etude sur DDI-glycoarray

Après contrôle de la bonne hybridation des différents glycoclusters sur la puce par lecture de la fluorescence à 532nm, la lectine marquée FliD_Alexa647 a été incubée pendant 3h à 37°C. Après lavages, la lecture de fluorescence du fluorophore Alexa-647 à 635nm permet de tracer, *Figure 4-17*, la moyenne des intensités de fluorescence en fonction des fucoclusters étudiés et ainsi obtenir les informations relatives à l'affinité de liaison pour chaque glycocluster.

Nous notons tout de suite que le témoin négatif choisi (DMCH-MTz EG₃-Man)₃ n'est peut-être pas pertinent car il présente un signal de fluorescence de 1499 u.a., assez élevée par rapport à celui du bruit de fond : 300 u.a. Il serait intéressant de changer de témoin négatif afin de s'assurer qu'il n'y ait aucune adsorption non spécifique de FliD à la surface du glycoarray.

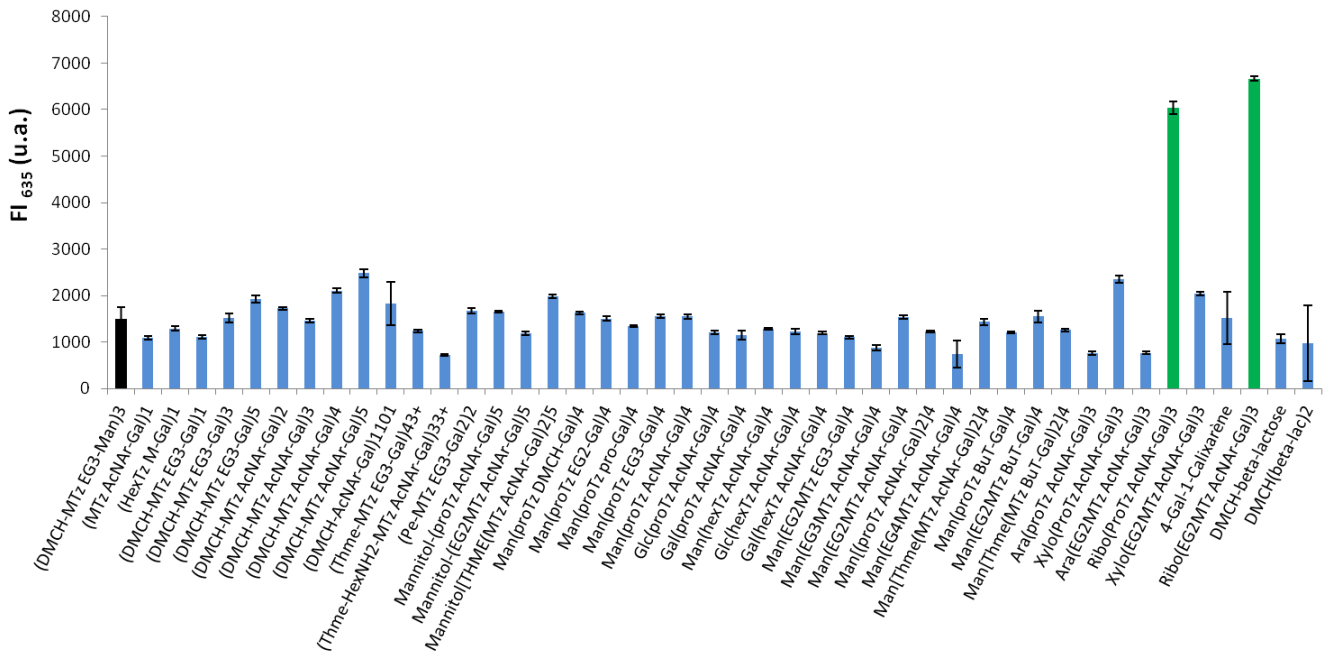


Figure 4-17 Moyenne des intensités de fluorescence (en u.a.) de FliD-Alexa647 à 635nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 64 répétitions.

Parmi la bibliothèque de galactoclusters, et malgré une fluorescence générale de l'Alexa647 assez faible par rapport à PA-IL et PA-IIL, nous remarquons que les deux structures cœur centré ribose semblent avoir une meilleure affinité vis-à-vis de FliD avec une FI₆₃₅ de 6662 u.a. pour le bras long ribo(EG₂MTz AcNAr-Gal)₃ et de 6042 u.a. pour le bras court ribo(proTz AcNAr-Gal)₃.

Nous pouvons expliquer cette faible fluorescence (maximum à 7000 u.a. contre 20000 u.a. environ pour les études sur PA-IL et PA-IIL) parce que FliD est spécifique des Lewis x et pas seulement des monosaccharides de type galactose. Cependant, actuellement, parmi la bibliothèque de glycoclusters, nous n'en possédons aucun présentant des résidus de type Lewis^x en résidus terminaux.

La structure cristalline de FliD n'ayant pas encore été déterminée, il nous est difficile de conclure quant aux potentielles interactions entre le galactocluster et le site de reconnaissance de FliD, néanmoins nous pouvons émettre l'hypothèse que le linker aromatique L2= AcNAr semble favorable mais surtout que la topologie induite par le cœur ribose semble être le paramètre permettant d'augmenter l'affinité vis-à-vis de FliD.

Plusieurs perspectives se présentent pour cette étude d'interaction sur FliD. La première est de trouver un témoin négatif afin de s'assurer qu'il n'y a pas adsorption non spécifique de FliD sur la surface des glycoarrays. La seconde de tester tous les fucoclusters et

l'hétéroglycocluster précédemment étudié (*partie 4.3*) vis-à-vis de FliD car le résidu terminal Lewis x présente également un fucose en résidu terminal en plus du galactose. Enfin, la synthèse de glycoclusters présentant des résidus Lewis x serait intéressante à mettre en œuvre avec les différentes topologies et natures de linkers possibles malgré sa difficulté plus importante par rapport à des résidus mono-saccharidiques.

4.5. Conclusions et Perspectives

Les lectines PA-IL, PA-III et FliD de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sont des facteurs de virulence. Elles sont donc des cibles pertinentes quant à la recherche de traitement thérapeutique contre l'infection bactérienne. Nous venons de présenter l'étude d'affinité d'une bibliothèque de galactoclusters vis-à-vis des lectines PA-IL et FliD, d'une bibliothèque de fucoclusters vis-à-vis de la lectine PA-III. L'influence de différents paramètres (topologie, nature des linkers, charges, valence) ont été étudiés afin de déterminer ceux présentant des effets plus ou moins favorables sur l'affinité avec les lectines. Cette étude préalable a été réalisée sur des lectines purifiées. Les perspectives devront être l'étude de ces sucres vis-à-vis de la bactérie entière in vitro (sur tapis cellulaire) puis in vivo. A ce jour, deux galactoclusters dirigés contre PA-IL sont en tests in vitro par Dr. Olivier VIDAL à l'UGSF à Lille.

A l'issue de ces expériences réalisées sur glycoarray et aux différentes hypothèses proposées sur l'effet de certains paramètres structuraux, il serait très intéressant de poursuivre la discussion avec la modélisation des complexes lectines/sucres. La modélisation apporterait de nouvelles informations structurelles au niveau moléculaire et permettrait de vérifier nos hypothèses proposées.

A ce jour, seules deux modélisations ont été courtoisement réalisées par « Docking » avec un algorithme de type Monte Carlo par Dr. Gérard VERGOTEN à l'UGSF à Lille. Le « Docking » est une méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule (glycocluster) vers une seconde (lectine) lorsqu'elles sont en interaction pour former un complexe stable. Déterminer l'orientation préférée sert à prévoir la solidité de l'union entre les deux molécules. Au cours du mécanisme d'interaction, les molécules s'ajustent pour améliorer leur liaison. Les prémices de ces modélisations vis-à-vis de PA-IL, par le logiciel de visualisation moléculaire en 3D Rastop, sont présentées ci-dessous (*Figure 4-18* et *Figure 4-19*).

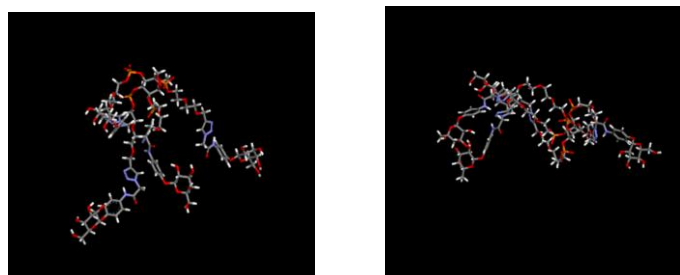


Figure 4-18 Modélisation des tétragalactoclusters $\text{Man}(\text{EG}_2\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ et $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ libres par le logiciel de visualisation moléculaire en 3D Rastop.

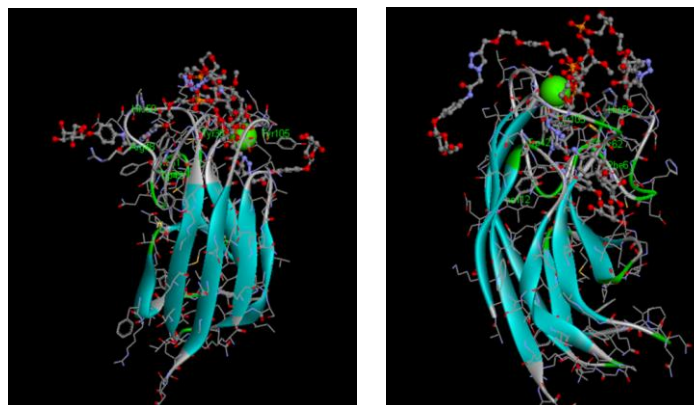


Figure 4-19 Modélisation des complexes $\text{Man}(\text{EG}_2\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ et $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ en interaction avec PA-IL (Rastop)

Il apparaît que les énergies de stabilisation, dans le vide, des tétragalactoclusters libres $\text{Man}(\text{EG}_2\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ et $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ sont respectivement de -16.60 et $-9.01 \text{ kcal.mol}^{-1}$ indiquant que le cluster à bras long ($\text{L1}=\text{EG}_3$) serait moins stable que son homologue à bras long ($\text{L1}=\text{EG}_2$). Au contraire les énergies de stabilisation des complexes tétragalactocluster/PA-IL sont respectivement de -155.33 et $-238.25 \text{ kcal.mol}^{-1}$ indiquant que le complexe PA-IL/ $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ serait plus stable que celui du cluster avec $\text{L1}=\text{EG}_2$. Cette information est en corrélation avec nos résultats de K_d déterminés sur ces deux clusters : 83 et 28 nM respectivement pour $\text{Man}(\text{EG}_2\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ et $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ où nous observons un K_d plus faible pour le mieux reconnu : $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$.

Il est à noter que pour l'instant, pour faciliter les calculs qui deviennent rapidement très complexes, PA-IL a été modélisée comme étant une lectine monovalente même si ce n'est pas le cas dans la réalité et que les calculs d'énergie des systèmes ont été réalisés dans le vide. Il s'agit d'une première modélisation sur les deux tétragalactoclusters $\text{Man}(\text{EG}_2\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ et $\text{Man}(\text{EG}_3\text{MTz AcNAr-Gal})_4$ libres ou liés à PA-IL. Il sera nécessaire de poursuivre par d'autres modélisations correspondant plus exactement à la réalité

Chapitre 5

Application du système d'analyse à d'autres cibles

Dans ce cinquième chapitre nous présentons les études des analyses d'affinité sucre/protéine sur DDI-glycoarray appliquées à d'autres cibles que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, à savoir la bactérie *Burkholderia ambifaria* (une espèce de protéobactérie), la plante *Viscum album* (gui, arbrisseau originaire des régions tempérées d'Europe), et enfin le virus Influenza. Dans une seconde partie nous abordons les premiers travaux sur l'adaptation de la méthode DDI sur une biopuce à surface d'or afin de pouvoir utiliser à terme, des systèmes de détection sans marquage des interactions.

5.1. Etude d'affinité sur une lectine de *Burkholderia Ambifaria* : BambL

Burkholderia ambifaria est une bactérie appartenant à la famille des *Burkholderia cenocepacia* (Bcc) (Sulak et al. 2011). C'est une bactérie gram-négative ayant des propriétés antifongiques intéressantes lui donnant un avantage sélectif environnemental. Habituellement non pathogène pour les personnes en bonne santé, elle peut causer une variété d'infections chez les patients immunodéprimés, comme par exemple chez les patients atteints de fibrose kystique (CF) ou mucoviscidose. Malheureusement, la plupart des souches sont très résistantes à toutes les principales classes d'antibiotiques et sont capables de former des biofilms, ce qui rend le traitement des patients infectés par *Burkholderia ambifaria* problématique. Un certain nombre de facteurs de virulence ont récemment été décrits et caractérisés chez cette bactérie : les pili, le flagelle, la lectine BambL et des enzymes sécrétées (Audfray et al. 2012).

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la lectine BambL, spécifique du fucose. A notre connaissance, encore peu d'études ont été réalisées sur cette lectine. Il semblerait qu'elle soit impliquée dans l'invasion bactérienne et la formation du biofilm. De plus, cette interaction fucose/BambL est stabilisée par six liaisons hydrogènes avec les acides aminés : l'acide glutamique²⁶ lié aux oxygènes numéro 2 et 4 (O₂ et O₄), l'alanine³⁸ liée à O₂, le

tryptophane79 à O₄ et l'arginine15 liée à O₄ (Figure 5-1). Pour l'instant aucun glycocluster dirigé contre BambL n'a été réalisé.

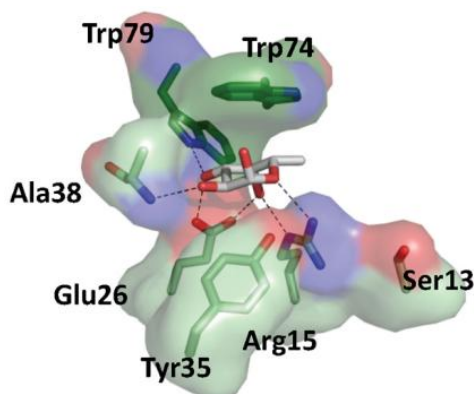


Figure 5-1 Représentation de l'interaction BambL / fucose (Audfray et al. 2012)

Afin de déterminer des clusters multivalents possédant une haute affinité pour BambL, l'influence de la topologie, de la rigidité et de la longueur de plusieurs linkers ont été étudiées par DDI-glycoarray. Il s'agit donc de tester BambL sur notre bibliothèque de fucoclusters. Leur structure générale est la même que sur la Figure 4-1.

5.1.1.1. Glycoclusters étudiés

Les fucoclusters synthétisés ont une structure générale comme représentée (Figure 4-1). Ils peuvent être linéaires en peigne, antonné ou à cœur centré (pyranose ou hexose), (furanose ou pentose) et portent tous un ADN-Cy3 permettant une immobilisation orientée et contrôlée sur un support. Un premier linker L1 relie le squelette phosphorylé (cœur) au triazole (Tz) et un deuxième linker L2 relie le triazole au résidu terminal.

Pour l'étude effectuée sur BambL, 4 familles de fucoclusters ont été évaluées :

- 5) Les linéaires en peigne avec un nombre de résidus terminaux variant de 1 à 5.
- 6) Les linéaires antonnés avec 4, 5, ou 10 résidus terminaux.
- 7) Les cœurs centrés pyranose (ou bien hexose) : Mannose, Galactose, Glucose avec 4 ou 8 résidus terminaux.
- 8) Les cœurs centrés furanose (ou bien pentose) : Arabinose, Ribose, Xylose avec 3 résidus terminaux.

Des contrôles en tri-mannoses mono- ou tri-galactoses ont été prévus. Tous ces fucoclusters sont listés dans le Chapitre 2.

5.1.1.2. Étude sur DDI-glycoarray

Après contrôle de la bonne hybridation des différents glycoclusters sur la puce par lecture de la fluorescence à 532nm, la lectine marquée BambL_Alexa647 a été incubée pendant 3h à 37°C. Après lavages, l'intensité de fluorescence a été lue à 635nm (FI_{635}) afin d'obtenir les informations relatives à l'affinité de liaison pour chaque glycocluster (*Figure 3-13*).

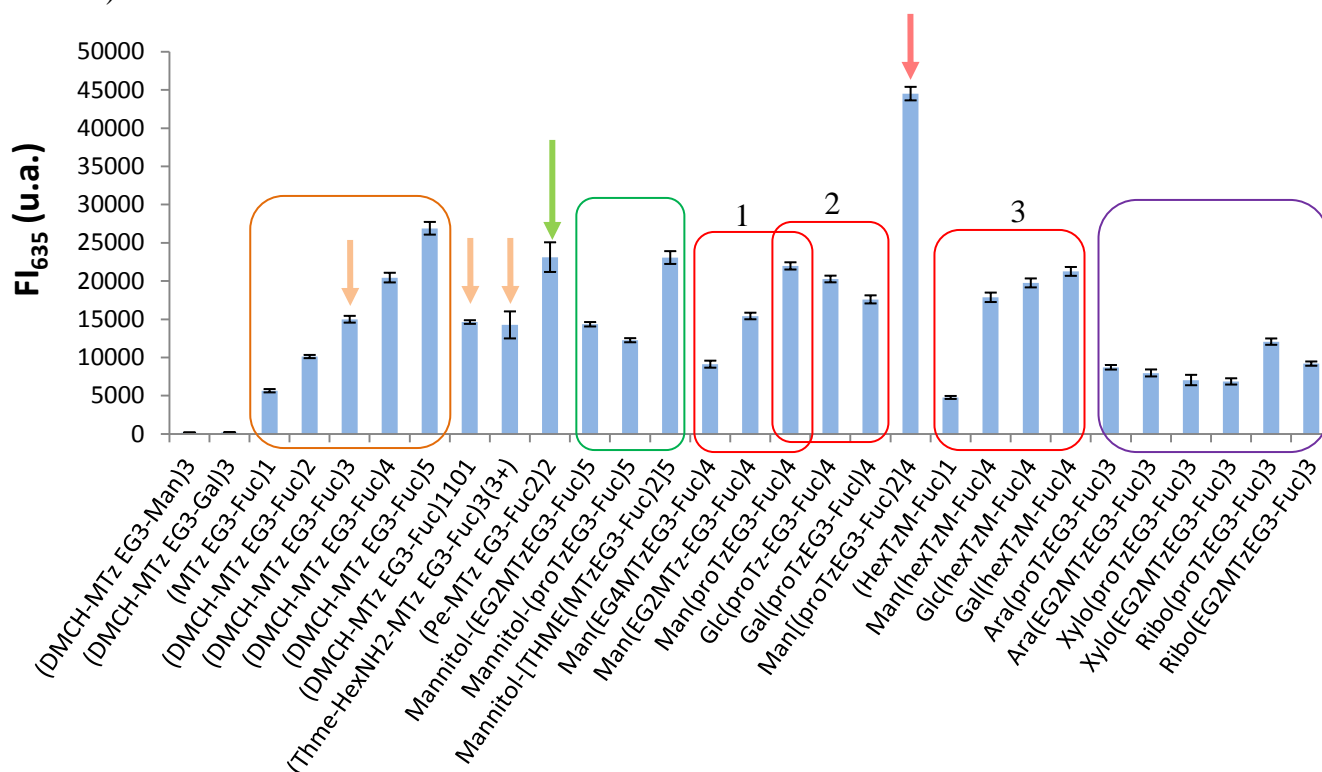


Figure 5-2 Moyenne des intensités de fluorescence (en u.a.) de BambL-Alexa647 à 635nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 64 répétitions.

Pour rappel, plus le signal de fluorescence de l'Alexa647-PA-IL (FI_{635}) est élevé, plus l'affinité sucre/lectine est forte. De ce fait, (DMCH-MTz EG₃-Man)₃ et (DMCH-MTz EG₃-Gal)₃ sont bien contrôlés comme témoin négatif car non reconnus par BambL (FI_{635} = 159 u.a. et 182 u.a. respectivement).

Pour les linéaires en peigne avec le squelette phosphorylé DMCH nous observons une augmentation de la fluorescence en fonction de l'augmentation du nombre de résidus (entourés en orange *Figure 3-13*). La FI_{635} passe de 5638 u.a. pour (MTz EG₃-Fuc)₁ à 26892 u.a. pour (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₅.

Plusieurs trifucoclusters sont comparés les uns avec les autres et désignés par une flèche orange sur la *Figure 3-13*. La FI_{635} du trifucocluster comportant deux fucoses proches et un éloigné, (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₁₁₀₁, donne une valeur très proche du trifucocluster

comportant trois fucoses contigus, (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₃, respectivement de 14625 u.a. et 14991 u.a. Ainsi la présence d'un espace entre les bras espaceurs n'apporte aucune amélioration d'affinité ; il n'y a pas de gêne stérique lorsque le trifucocluster contigu interagit avec BamBL.

De plus, on note également que la charge positive ne permet pas d'augmenter l'affinité avec BamBL car la FI₆₃₅ du (Thme-HexNH₂-MTz EG₃-Fuc)₃³⁺ est comparable à celle du trifucose contigu non chargé. Pourtant, nous aurions pu nous attendre à une augmentation de la fluorescence. En effet, le point isoélectrique (pI) de la lectine BamBL vaut 5.53 donc à pH 7.4 elle est chargée négativement. Ainsi, le fucocluster triplement chargé positivement aurait pu résulter d'interactions électrostatiques favorables comme observé pour PA-IL. Dans le cas de BamBL, le facteur déterminant semble être la topologie plus que l'interaction supplémentaire engendré par la charge positive.

Pour les linéaires antennés avec le squelette phosphorylé mannitol (entourés en vert *Figure 3-13*), les FI₆₃₅ des penta-fucoclusters sont du même ordre de grandeur : 14334 u.a. pour le linker L1 long Mannitol-(EG₂MTz EG₃-Fuc)₅ contre 12248 u.a. le pour le linker L1 court Mannitol-(proTz EG₃-Fuc)₅. Le linker L1=EG₂, apportant une plus grande flexibilité que le propyle afin de s'adapter au site de reconnaissance, expliquerait cette petite différence. Notons que ce phénomène a déjà été rencontré avec les lectines PA-IL et PA-III.

De plus, le passage d'une valence de 5 à 10 permet d'observer l'effet du nombre car la FI₆₃₅ du déca-fucocluster est augmentée d'un facteur 1,8 par rapport au penta-fucocluster. Là encore, on n'observe pas un effet cluster exaltant considérablement l'affinité, la fluorescence est augmentée linéairement en fonction de la valence.

Concernant la topologie apportée par le cœur, il semblerait que le cœur basé sur Pe soit le plus adapté au site de reconnaissance de BamBL. En effet, le tétra-fucocluster linéaire antenné à cœur Pe, désigné par une flèche verte sur la *Figure 3-13*, présente une FI₆₃₅ de 23116 u.a. En comparant avec le tétra-fucocluster linéaire en peigne DMCH (DMCH-MTz EG₃-Fuc)₄, sa FI₆₃₅ est 1.13 fois plus élevée et en comparant avec l'antenné Mannitol-(EG₂MTz EG₃-Fuc)₅, sa FI₆₃₅ est 1.61 fois plus élevée. On a cœur Pe > DMCH > mannitol. Ainsi, il serait intéressant de tester un déca-fucocluster à cœur Pe afin de tester s'il y a un effet cluster qui augmenterait exponentiellement la fluorescence. On peut penser que le cœur Pe apporte une certaine rigidité à la structure et présente des fucoses de part et d'autre de son squelette phosphorylé permettant ainsi de se lier avec BamBL de chaque côté. D'autre part, le cœur

DMCH semble intéressant car il y a une possibilité de créer des interactions π - π hydrophobes, bénéfiques pour la reconnaissance avec BamBL.

Pour les cœurs centrés hexose, avec le squelette phosphorylé cœur mannose (1^{er} carré en rouge *Figure 3-13*), les FI_{635} des tétrafucoclusters augmentent d'un facteur environ 1,5 avec la rigidité du linker : pour L1= EG₄ on a 9113 u.a., 15417 u.a. pour L1= EG₂ et 21970 u.a. pour L1= pro. Il y a bien un effet de la longueur des bras mais c'est un effet inverse comparé aux lectines PA-IL et PA-IIL où le bras long EG₄ était le mieux reconnu.

Nous étudions l'influence du cœur hexose en comparant Man(proTz EG₃-Fuc)₄, Glc(proTz EG₃-Fuc)₄ et Gal(proTz EG₃-Fuc)₄ (2nd carré en rouge *Figure 3-13*). On note : Man > Glc > Gal. Par contre, dans le 3^{ème} carré en rouge *Figure 3-13*, avec le linker L1=hex, nous observons le classement inverse : Gal > Glc > Man. Nous pouvons conclure que la nature optimale du cœur pour l'interaction avec BamBL est fonction de la nature du linker L1.

D'autre part, comme pour les linéaires mannitols, doubler la valence du fucocluster permet de doubler la FI_{635} . En effet l'intensité de fluorescence passe de 21970 u.a. pour Man(proTz EG₃-Fuc)₄ avec 4 résidus fucoses à 44511 u.a. pour 8 résidus fucoses portés par Man[(proTz EG₃-Fuc)₄]₂.

Pour les cœurs centrés pentoses (entourés en violet *Figure 3-13*), de manière générale les FI_{635} sont plus faibles qu'avec les autres topologies. Ainsi, quelque soit le linker (L1= EG₂ ou Pro), il semblerait que les cœurs pentose ne soient pas adaptés au site de reconnaissance de BamBL.

De cette étude d'affinité vis-à-vis de BamBL de la bibliothèque de fucoclusters, nous pouvons conclure que le meilleur glycomime est l'octafucocluster à cœur mannose : Man[(proTz EG₃-Fuc)₄]₂. Toutefois, il serait intéressant de tester ce type de structure en augmentant la valence et en ajoutant la base Pe dans la structure afin d'augmenter significativement son affinité et de voir s'il y a un effet cluster.

5.2. Etude d'affinité sur une lectine de *Viscum album* : VAA (*Viscum album L. agglutinin*)

Viscum album, ou plus communément appelé gui, est un arbrisseau originaire des régions tempérées d'Europe. VAA est une agglutinine, c'est-à-dire une lectine capable d'entraîner une agglutination, de masse moléculaire 120000 g.mol⁻¹. Cette lectine végétale est très toxique (He et al. 2009). Elle est capable de se fixer sur les parois cellulaires entraînant l'inhibition de

la synthèse de protéines essentielles. De plus, elle entraîne l'apoptose des cellules sur lesquelles elle s'est fixée (Lavastre et al. 2002). Ainsi VAA, **spécifique du galactose**, a été testée sur dix galactoclusters de notre bibliothèque. Le résidu mannose a été utilisé comme témoin négatif (He et al. 2009).

5.2.1.1. Étude sur DDI-glycoarray

Après contrôle de la bonne hybridation des différents glycoclusters sur la puce par lecture de la fluorescence à 532nm, la lectine marquée VAA_Alexa647 a été incubée pendant 3h à 37°C. Après lavages, l'intensité de fluorescence a été lue à 635nm (FI_{635}) afin d'obtenir les informations relatives à l'affinité de liaison pour chaque glycocluster (Figure 5-3).

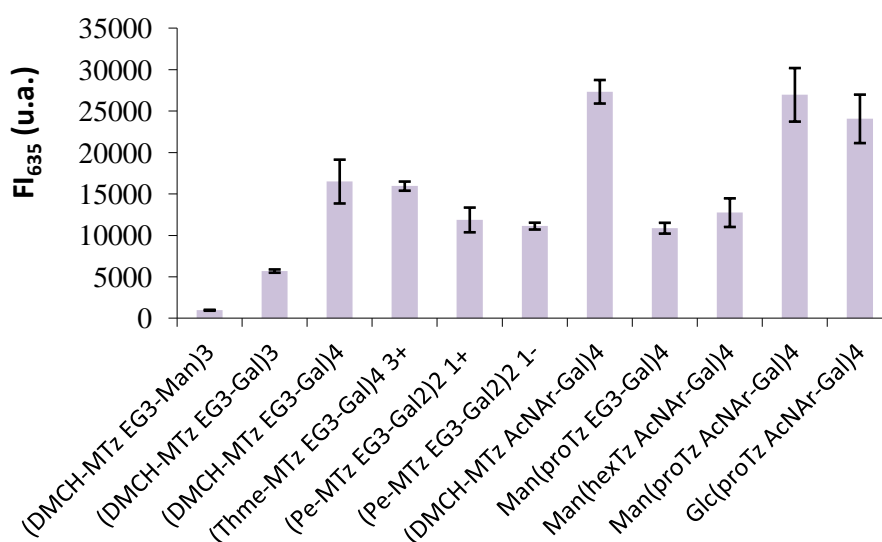


Figure 5-3 Moyenne des intensités de fluorescence (en u.a.) de VAA-Alexa647 à 635nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 4 répétitions.

Nous remarquons que le (DMCH-MTz EG₃-Man)₃, donne une fluorescence à 973 u.a., fluorescence inférieure à celles obtenues pour tous les galactoclusters mais toutefois élevée par rapport au bruit de fond qui est généralement de l'ordre de 100 u.a. Il serait intéressant de trouver un meilleur contrôle négatif peut-être de type fucocluster.

Concernant la charge du galactocluster, il semblerait qu'elle ne soit pas prépondérante. En effet, la fluorescence de VAA-Alexa647 est du même ordre de grandeur pour le galactocluster linéaire antenne positif (Pe-MTz EG₃-Gal)₂ 1⁺ et le linéaire antenne négatif (Pe-MTz EG₃-Gal)₂ 1⁻. On peut tirer la même conclusion avec les linéaires en peigne non chargés (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄ et triplement chargés positivement (Thme-MTz EG₃-Gal)₄ 3⁺.

Concernant l'augmentation de la valence, il semblerait qu'elle induise un léger effet cluster car le tétravalent (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄ est 3 fois mieux reconnu que le trivalent (DMCH-MTz EG₃-Gal)₃.

D'autre part, comme observé pour la lectine PA-IL étudiée dans le *Chapitre 4*, le linker L2 a un effet important sur l'augmentation de l'affinité sucre/VAA car le tétragalactocluster (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄ avec L2=AcNAr est presque 2 fois mieux reconnu que celui avec L2=EG₃ : (DMCH-MTz EG₃-Gal)₄. Ainsi, l'effet des linkers, plus que la topologie, est un paramètre influençant positivement l'interaction car le Man(proTz AcNAr-Gal)₄ est quasiment aussi bien reconnu que son homologue linéaire (DMCH-MTz AcNAr-Gal)₄ et deux fois mieux reconnu que le cœur centré Man(hexTz AcNAr-Gal)₄. Il semblerait que le linker L1=hex soit trop long et flexible ce qui diminuerait la probabilité pour les résidus galactose terminaux d'interagir avec la poche de fixation de la lectine VAA.

De cette étude d'affinité vis-à-vis de VAA de la bibliothèque de galactoclusters, nous pouvons conclure que la lectine VAA possède une forte affinité pour les galactoclusters tétravalents linéaires DMCH ou à cœur centré mannose avec un linker L1 hydrophobe type propyle et un linker L2 aromatique type AcNAr.

5.3. Etude d'affinité sur des Galectines

L'appellation Galectine est une dénomination regroupant les lectines animales de type S-lectines et spécifiques des β-galactosides et dont le domaine de reconnaissance est fortement conservé. Contrairement aux autres lectines, l'interaction sucre/galectine est indépendante de la présence de cations divalents type Ca²⁺ comme rencontrés pour les lectines PA-IL et PA-IIL, par exemple. Les galectines sont cytoplasmiques, nucléaires ou retrouvées en zone péricellulaire et sont regroupées en huit familles en fonction de leur type (simple, double ou chimère) (Leffler et al. 2004) (*Figure 5-4*). Les galectines de type simple sont constituées de deux monomères identiques. Celles de type double, dont la structure primaire est partiellement différente, possèdent deux sites de liaison. Ces hétérogénéités font penser que ces galectines peuvent assembler des β-galactosides dissemblables. Le type chimère, est actuellement décrit pour une seule galectine : la galectine-3. Elle est organisée en deux domaines très différents et bien dissociés contrairement aux deux autres types où les sites de liaison sont reliés soit directement pour le type simple, soit par des chaînes polypeptidiques pour le type double.

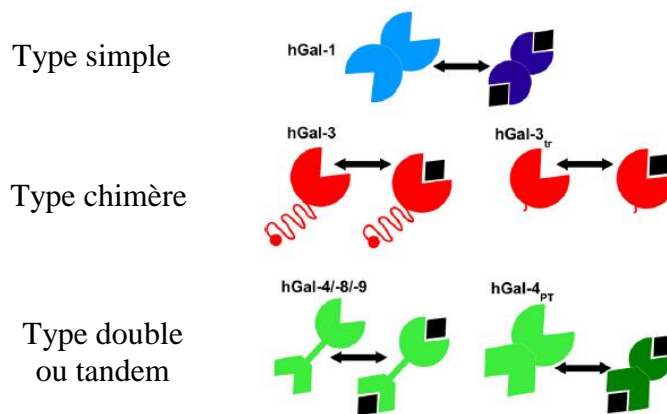


Figure 5-4 Illustration des trois types d'arrangements spatiaux lors de l'interaction galectine/sucre (Goehler et al. 2010)

Il a été montré que les galectines possèdent des affinités supérieures pour les peptides et les glycoprotéines lactose et N-acetyllactosamine (Yoshioka et al. 2010).

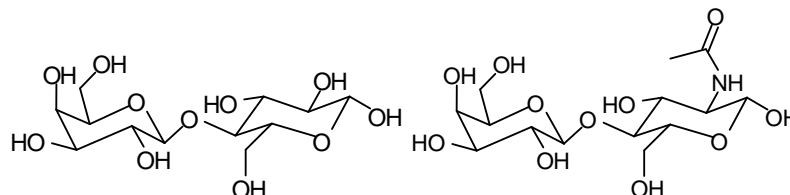


Figure 5-5 Représentation du lactose (gauche) et N-acetyllactosamine (droite)

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à la galectine humaine h-Gal₄. C'est une galectine de type tandem (double) et de masse moléculaire 32000 g.mol⁻¹. Cette lectine est fortement exprimée lorsque l'individu est atteint d'un cancer du sein ou du foie. L'équipe de Gölher *et al.* a étudié ses propriétés thermodynamiques par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et cette galectine nécessiterait une sorte de compactage grâce à la flexibilité du « bras » reliant ses deux sites de fixation (CRD) (Goehler et al. 2010). Ainsi, h-Gal₄, spécifique du galactose, a été testée sur dix galactoclusters de notre bibliothèque. Le résidu mannose a été utilisé comme témoin négatif.

5.3.1.1. Étude sur DDI-glycoarray

Après contrôle de la bonne hybridation des différents glycoclusters sur la puce par lecture de la fluorescence à 532nm, la lectine marquée h-Gal₄_Alexa647 a été incubée pendant 3h à 37°C. Après lavages, l'intensité de fluorescence a été lue à 635nm (FI₆₃₅) afin d'obtenir les informations relatives à l'affinité de liaison pour chaque galactocluster (Figure 5-6).

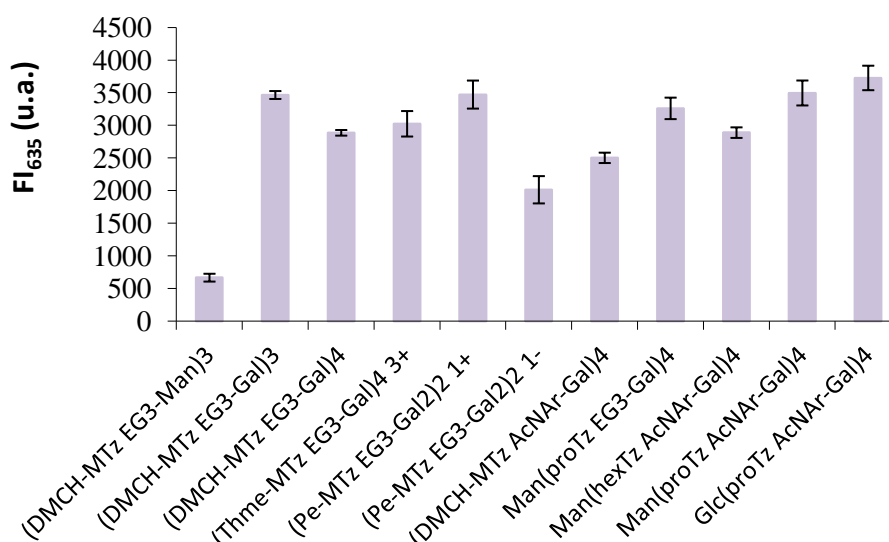


Figure 5-6 Moyenne des intensités de fluorescence (en u.a.) de hGal-4_Alexa647 à 635nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard de 4 répétitions.

Nous remarquons que la fluorescence maximum est de l'ordre de 4000 u.a. ce qui est assez faible. Il semblerait que la galectine h-Gal4 soit peu affine pour les dix galactoclusters testés. Toutefois, lorsque le glycocluster porte une charge négative, cela semble défavorable. En effet, la FI₆₃₅ de (Pe-MTz EG₃-Gal)₄¹⁻ vaut 2013 u.a. tandis que celle du monochargé positivement (Pe-MTz EG₃-Gal)₄¹⁺ est de 3470 u.a. Contrairement aux autres lectines, le cœur centré glucose Glc(protoTz AcNAr-Gal)₄ est légèrement mieux reconnu que le cœur mannose mais les différences étant faibles, il est difficile de conclure clairement sur cette galectine vis-à-vis de la bibliothèque de galactoclusters.

Après avoir utilisé cette méthode d'analyse par glycoarray à la lectine BambL de la bactérie *Burkholderia ambifaria* et à la galectine VAA de la plante *Viscum album*, ce système glycoarray a été utilisé pour l'étude de l'activité enzymatique et la spécificité de la neuraminidase (NA) du virus Influenza, sur virus entier.

5.4. Etude de l'activité enzymatique et de la spécificité d'une protéine virale du virus de la grippe

5.4.1. Virus de la grippe

Le virus de la grippe comporte trois protéines membranaires : l'Hémagglutinine (HA) et la Neuraminidase (NA) et la protéine M2 qui sont impliquées dans le cycle infectieux du virus sur la cellule hôte (Figure 5-7). Le virus entre dans la cellule hôte via une interaction

HA/sialyllactose, puis il utilise le matériel génétique de la cellule pour se répliquer et enfin, les nouveaux virus formés sont relargués en dehors de la cellule grâce à la digestion (ou coupure) de la liaison HA/sialyllactose par les NA et vont à leur tour infecter d'autres cellules (von Itzstein 2007). Le cycle de vie du virus est expliqué par le schéma ci-dessous (*Figure 5-7*).

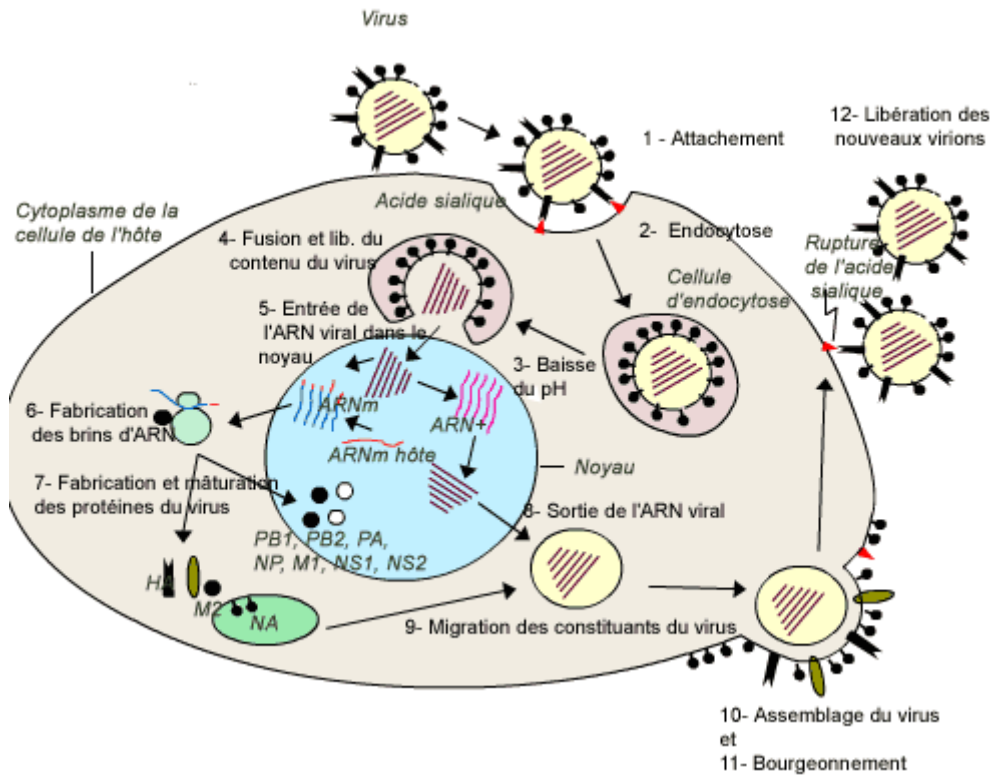


Figure 5-7 Le cycle de vie du virus et les cibles des composés thérapeutiques
 (http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemies-et-agents-infectieux/comprendre/grippe-aviaire/images_cycle_virus/virus_cycle500.gif/view 2013)

Plus particulièrement, la *Figure 5-8* représente l'interaction HA/acide sialique entre les HA du virus de la grippe et les acides sialiques présents sur les glycoconjugués (sucres) à la surface de la cellule hôte. C'est la spécificité des HA vis-à-vis de la liaison de l'acide sialique avec le lactose (soit α -2.3, soit α -2.6) qui détermine la nature aviaire ou humain de la grippe. En effet, l' α -2,6-sialylglycoconjugué est spécifique des HA du virus humain tandis que l' α -2,3-sialylglycoconjugué est spécifique des HA du virus aviaire.

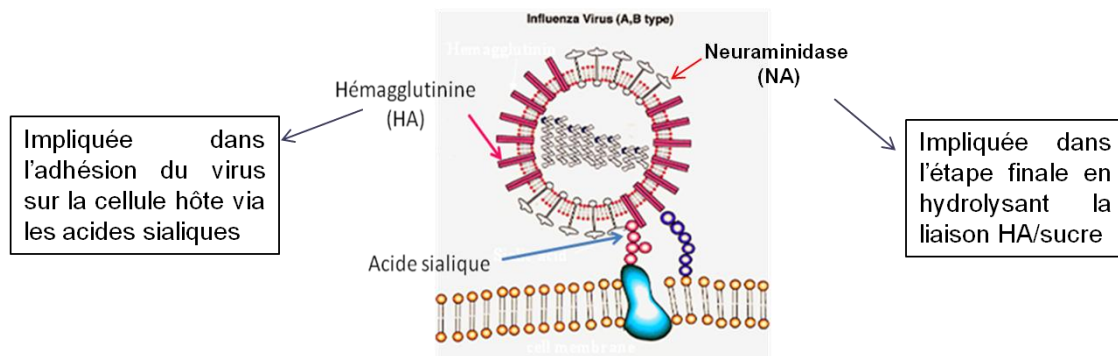


Figure 5-8 Représentation du virus influenza, avec ses protéines HA et NA, infectant une cellule (<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch112/influenza.htm> 2013)

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la comparaison de l'activité de deux souches virales : un virus humain H₃N₂ et un virus aviaire H₅N₂. Elle a été divisée en deux sous-parties. D'une part nous avons souhaité développer un test sur glycoarray permettant d'étudier l'activité enzymatique par les NA de la digestion (ou coupure) de la liaison entre l'acide sialique/HA et le lactosylglycoconjugué. Ce dernier peut soit être l' α -2,6-sialylglycoconjugué, soit l' α -2,3-sialylglycoconjugué respectivement nommés **6'-SL** et **3'-SL** par la suite. D'autre part, nous avons souhaité étudier la spécificité de cette coupure.

5.4.2. Etude de l'activité enzymatique de la neuraminidase

La neuraminidase (ou NA) est une enzyme qui joue un rôle dans l'étape finale du cycle viral en hydrolysant les liaisons entre l'acide sialique/HA et le lactosylglycoconjugué permettant ainsi la libération des particules virales néo-synthétisées retenues par les HA. Les acides sialiques servent donc de point d'accrochage pour le virus. D'ailleurs le Tamiflu (de principe actif Oseltamivir) et le Relenza (de principe actif Zanamivir) constituent une alternative aux vaccins. Ce sont des inhibiteurs de la NA. Ils empêchent cette coupure (hydrolyse) donc empêchent la libération des virions afin qu'ils ne puissent pas se propager dans le corps et infecter d'autres cellules.

Le but a été de développer un test sur glycoarray permettant l'étude cinétique de cette digestion enzymatique. La *Figure 5-9* présente les deux sialyllactose étudiés : **6'-SL** et **3'-SL**. L'action des NA sur ces derniers aboutit à la formation du lactosylglycoconjugué présentant un résidu terminal galactose. Ainsi le disaccharide lactose (ou **L**) a été choisi comme témoin positif.

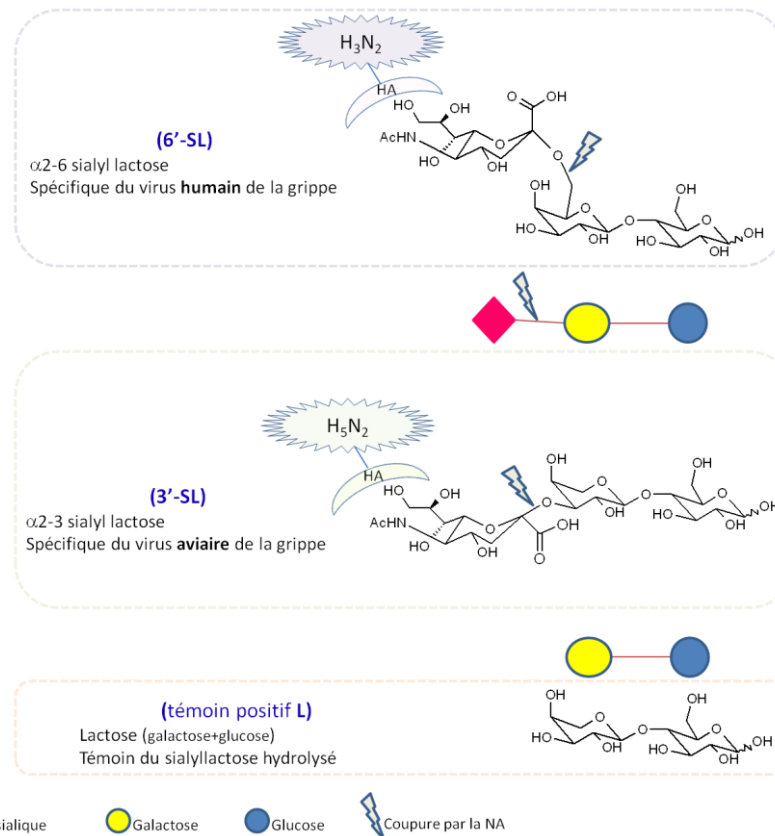


Figure 5-9 Représentation schématique des acides sialiques 6'-SL et 3'-SL, récepteurs des HA des virus humain (H_3N_2) et aviaire (H_5N_2) respectivement. Schéma d'action de la NA des virus sur les acides sialiques. Représentation schématique du lactose (L), témoin positif des sialyllactose hydrolysés.

La coupure de la liaison entre l'acide sialique/HA et le lactosylglycoconjugué par les NA du virus a été étudiée par glycoarray et un suivi par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été effectué en parallèle afin de comparer les résultats des deux méthodes.

Les glycoarrays sont préparés tout d'abord par immobilisation de trois séquences ADN complémentaires une à une aux séquences portées par les glycoconjugués 6'-SL, 3'-SL et L. Ces derniers sont incubés dans des aliquots avec un des virus (H_3N_2 ou H_5N_2) à des concentrations différentes. A différents temps, des prélèvements ont été effectués et analysés après que les virus présents dans l'échantillon aient été inactivés par thermolyse (95°C, 5min). Les produits de l'incubation ont été hybridés sur la lame puis on a procédé à la révélation de la coupure grâce à la lectine RCA₁₂₀* (spécifique du galactose (Utsumi et al. 1989)). La RCA₁₂₀ est marquée par le fluorophore Cy5. La lecture de la fluorescence permet une quantification directe normalisée du taux de composés hydrolysés, et donc de l'activité enzymatique. Le schéma expérimentale est expliqué *Figure 5-10*. Théoriquement, s'il y a une coupure de la liaison entre l'acide sialique/HA et le lactosylglycoconjugué par les NA, le

résidu terminal galactose est reconnu par la lectine RCA₁₂₀ et il y a formation du complexe lactose-RCA₁₂₀. Au contraire, s'il n'y a pas d'activité enzymatique, l'acide sialique n'est pas hydrolysé pour donner le sialyllactose correspondant donc ne sera pas reconnu par la lectine RCA₁₂₀.

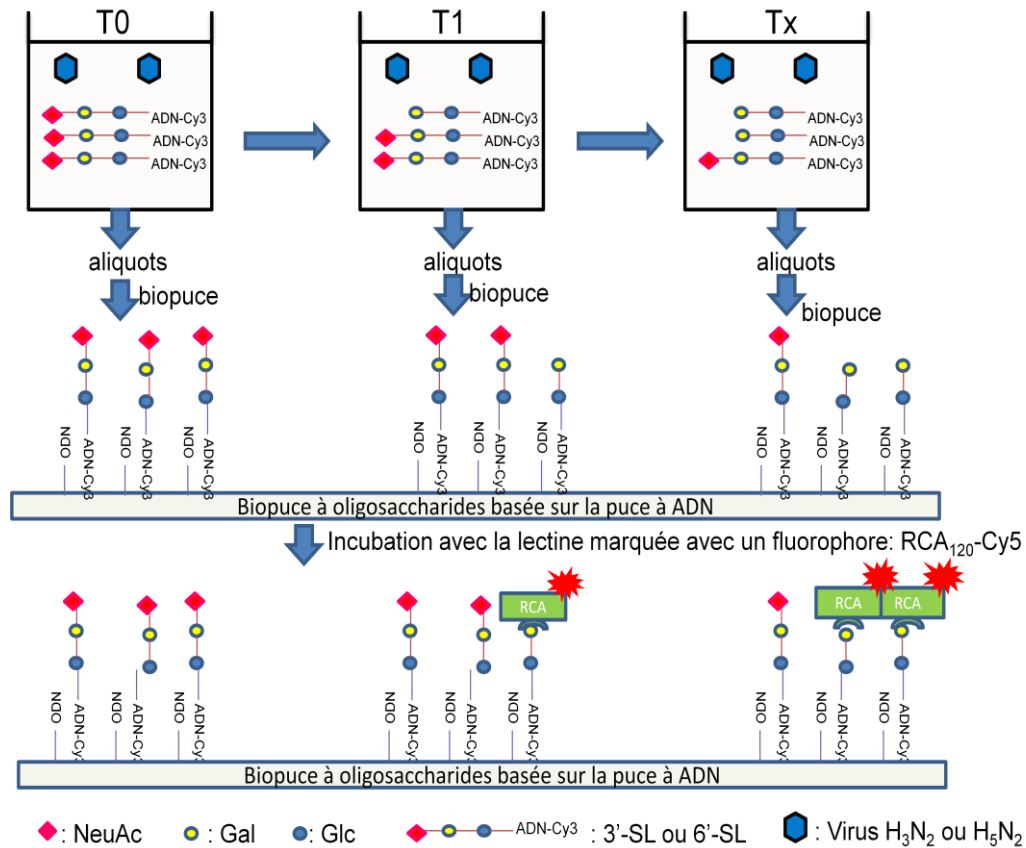


Figure 5-10 Représentation de la révélation de la coupure saccharidique, par la NA du virus influenza, grâce à la lectine (RCA₁₂₀) spécifique du galactose. D'après (Pourceau et al. 2011)

En parallèle, une expérience de contrôle a été effectuée. Il s'agit d'un contrôle négatif. Les deux glycoconjugués : 6'-SL et 3'-SL ont été incubés avec chacun des virus en présence de zanamivir (inhibiteur de la neuraminidase) permettant de bloquer l'activité de la NA. Nous contrôlons bien qu'en présence de zanamivir, aucune digestion de 6'-SL ni 3'-SL n'a été observée après 300 min d'incubation avec chaque virus par rapport à l'échantillon T₀.

En virologie, les virus sont caractérisés par leur titre viral, exprimé en TCID₅₀/mL* qui correspond au nombre de particules infectieuses par millilitre capables d'infecter 50% de la culture cellulaire. Etant donné que nous ignorions l'activité enzymatique des souches vis-à-vis de nos composés, nous avons choisi d'utiliser trois titres différents de virus : 10⁸, 10⁷, 10⁶ TCID₅₀/mL. Les différentes conditions expérimentales testées sont résumées *Tableau 5-1*.

Conditions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Virus	A(H ₃ N ₂)						A(H ₅ N ₂)					
Glycoconjugué	3'-SL			6'-SL			3'-SL			6'-SL		
TCID ₅₀ /mL	8.10 ⁷	8.10 ⁶	8.10 ⁵	8.10 ⁷	8.10 ⁶	8.10 ⁵	8.10 ⁷	8.10 ⁶	8.10 ⁵	8.10 ⁷	8.10 ⁶	8.10 ⁵

Tableau 5-1 Conditions expérimentales utilisées pour l'étude de l'activité enzymatique des neuraminidases. 3'-SL et 6'-SL ont été incubés avec les virus A(H₃N₂) ou A(H₅N₂) à différentes concentrations : TCID₅₀/ml of 8.10⁷, 8.10⁶ and 8.10⁵.

Pour calibrer le test, plusieurs mélanges de 6'-SL contenant une quantité croissante de L ont été déposés sur glycoarray (Figure 5-11). Un plateau a été observé de 0 à 40% en L, et au-dessus de 40% en L, le signal de fluorescence augmente de façon exponentielle. Zhang *et al.* ont étudié l'effet de la densité de surface en glycocluster sur la reconnaissance par la lectine RCA₁₂₀. Il a été observé un effet seuil similaire ; en deçà d'une certaine densité de surface, aucune interaction glycocluster/lectine n'est observée, bien que la fluorescence à 532nm montre une immobilisation effective du glycocluster (Zhang *et al.* 2009a). Un comportement similaire est probablement observé ici étant donné que la concentration en lactose (L) augmente dans le mélange 6'-SL/L.

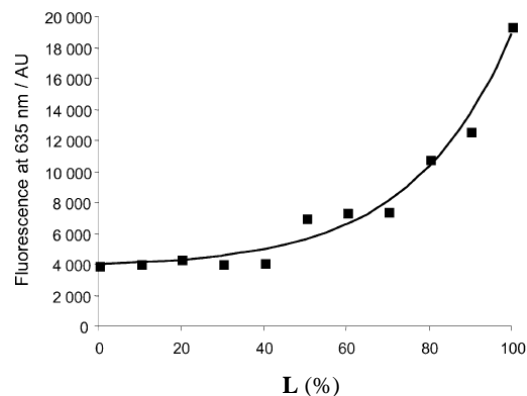


Figure 5-11 Courbe de calibration de G3 contenu dans un mélange G1/G3 pour l'analyse par glycoarray (Pourceau *et al.* 2011)

Notre étude cinétique a duré 5 heures. La Figure 5-12 présente la moyenne du signal de fluorescence à 635 nm de la lectine marquée Cy5-RCA₁₂₀, lectine liée aux acides sialiques hydrolysés (lactosylglycoconjugués) par le virus H₃N₂ à 8.10⁶ TCID₅₀/ml, en fonction du temps. Cette figure correspond à la cinétique de digestion des acides sialiques par les NA du virus humain de la grippe. Nous remarquons que, dans le temps, le signal varie d'un sucre à l'autre mais que dans les deux cas (pour le 3'-SL et 6'-SL) il y a une augmentation du signal de fluorescence à 635nm. Ainsi, comme les courbes sont croissantes, nous pouvons dire que la liaison saccharidique est hydrolysée par la NA des virus aviaire et humain, que l'acide sialique soit lié en position 6 ou 3 du galactose.

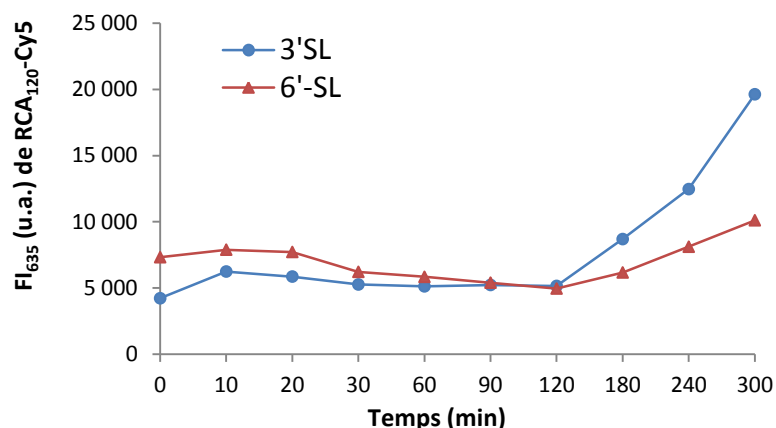


Figure 5-12 Cinétiques de digestion des sucres 6'-SL et 3'-SL conduisant au sucre hydrolysé lactose (L) avec le virus A (H_3N_2) = 8.10^5 TCID₅₀/ml calculé à partir du signal de fluorescence du Cy5-RCA₁₂₀. (Pourceau et al. 2011)

Lorsque les glycoconjugués 6'-SL et 3'-SL ont été incubés avec le virus aviaire H₅N₂ (Figure 5-13), aucune augmentation de signal de fluorescence du Cy5-RCA₁₂₀ n'a été observé au bout de 120 min pour 6'-SL et finalement pour atteindre 20% de digestion après 300 minutes. En revanche pour 3'-SL, la cinétique a été très rapide puisqu'il a quasiment été totalement hydrolysé en 120 minutes.

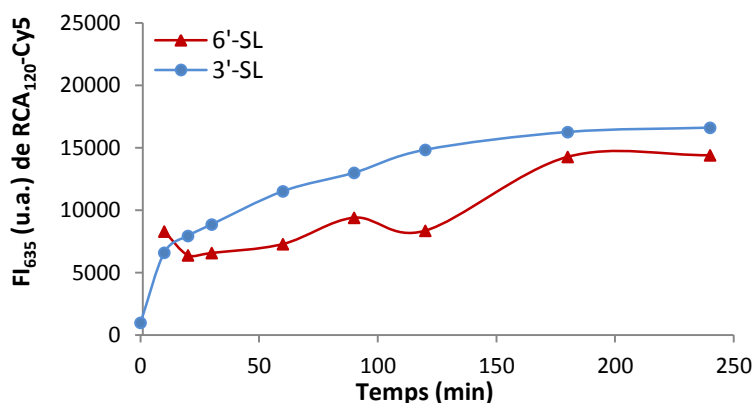


Figure 5-13 Cinétiques de digestion des sucres 6'-SL et 3'-SL conduisant au sucre hydrolysé lactose (L) avec le virus B (H_5N_2) = 8.10^6 TCID₅₀/ml calculé à partir du signal de fluorescence du Cy5-RCA₁₂₀. (Pourceau et al. 2011)

De cette étude nous pouvons conclure que les virus humain (H_3N_2) et aviaire (H_5N_2) hydrolysent les deux sialyllactoconjugués α -2,6-sialylglycoconjugué (6'-SL) et α -2,3-sialylglycoconjugué (3'-SL). Néanmoins, le virus aviaire H₅N₂ a une activité enzymatique globalement inférieure au virus humain H₃N₂ car il hydrolyse plus lentement les 3'-SL et 6'-SL.

5.4.3. Etude de la spécificité de la neuraminidase

Nous avons comparé la spécificité des NA pour les sialyllactoconjugués α -2,6-sialylglycoconjugué (**6'-SL**) et α -2,3-sialylglycoconjugué (**3'-SL**) grâce aux analyses par glycoarray et par MALDI-TOF et enfin nous avons évoqué les problèmes rencontrés quant aux concentrations en virus trop élevées.

Tout d'abord, en nous appuyant sur les *Figure 5-12* et *Figure 5-13*, nous avons remarqué que l'augmentation de signal de fluorescence est plus forte pour 3'-SL que pour 6'-SL signifiant que l'hydrolyse du 3'-SL a été plus rapide que celle du 6'-SL. Nous pouvons donc conclure que quelque soit la souche virale : (H_3N_2 à 8.10^5 TCID₅₀/mL ou H_5N_2 à 8.10^6 TCID₅₀/mL), la spécificité est plus élevée pour le 3'-SL que pour le 6'-SL. Ceci est surprenant car le virus humain H_3N_2 est spécifique de l'homme donc il était attendu que sa NA coupe plus rapidement la liaison α -2,6. Concernant le virus aviaire H_5N_2 , le résultat est cohérent avec la théorie car sa NA coupe plus rapidement la liaison α -2,3.

Les analyses par MALDI-TOF confirment ces résultats et nous apportent des informations sur la demi-vie $t_{1/2}$. Le *Tableau 5-2* récapitule les résultats obtenus par MALDI-TOF.

TCID ₅₀ /mL	$t_{1/2}$ (en min) pour A(H_3N_2)		$t_{1/2}$ (en min) pour B(H_5N_2)	
	6'-SL	3'-SL	6'-SL	3'-SL
8.10^5	> 4000	224	(4% après 5h)	365
8.10^6	315	17	(18% après 5h)	25
8.10^7	24	< 2	267	16

Tableau 5-2 Demi-vie ($t_{1/2}$) de l'hydrolyse des 3'-SL et 6'-SL lors de l'incubation avec les virus A(H_3N_2) et B(H_5N_2) à différentes concentrations : TCID₅₀/ml of 8.10^7 , 8.10^6 and 8.10^5 .

Il apparait que quelque soit la concentration en virus humain ou aviaire, les demi-vies correspondant à l'hydrolyse du 3'-SL, par les NA de ces virus, sont inférieures à celle correspondant à l'hydrolyse du 6'-SL. En effet pour H_3N_2 à 8.10^5 TCID₅₀/mL par exemple, le 3'-SL est hydrolysé à moitié en 224 minutes contre un $t_{1/2} > 4000$ pour le 6'-SL. Un autre exemple pour H_5N_2 à 8.10^7 TCID₅₀/mL, le 3'-SL est hydrolysé à moitié en 16 minutes contre un $t_{1/2} = 267$ pour le 6'-SL.

On confirme, de plus, l'hypothèse émise dans la *partie 5.4.2*, que l'activité enzymatique de la NA du virus humain H_3N_2 est plus élevée que le virus aviaire (H_5N_2) car pour un même titre en virus (8.10^5 TCID₅₀/mL par exemple), le 3'-SL est hydrolysé plus vite : $t_{1/2} = 224$ minutes contre 365 minutes pour le 6'-SL.

Toutefois, il a été observé une valeur erratique lors de la mesure de fluorescence à 635 nm dans la cinétique d'hydrolyse par H₃N₂ à 8.10⁶ TCID₅₀/mL (Figure 5-14). Cette courbe a été obtenue après lavage de la lame pendant 1 minute au PBS-T_{0.05%}.

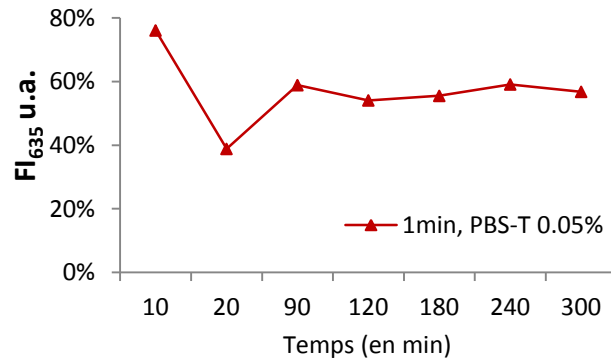


Figure 5-14 Cinétique de digestion du 6'-SL par les NA d'H₃N₂ à 8.10⁶ TCID₅₀/ml

Il a alors été supposé qu'au même TCID₅₀/mL, il pouvait y avoir de l'adsorption non spécifique, à la surface du glycoarray, de débris viraux portant des résidus galactosyl (glycolipides et/ou glycoprotéines). Débris provenant peut-être de l'activité hydrolytique de la NA d'acides sialiques présents à la base sur la membrane du virus. Pour confirmer cette hypothèse, une souche virale ne possédant pas de NA à sa surface a été testée : H₃N₀. En théorie il ne devrait pas y avoir de signal de fluorescence lorsque cette souche est en contact avec 3'-SL ou 6'-SL puisque ces derniers ne devraient pas être digérés. La Figure 5-15 présente la moyenne du signal de fluorescence de la RCA-₁₂₀ en fonction des souches virales H₃N₀ et H₃N₂ à 8.10⁷ TCID₅₀/mL. On remarque que H₃N₀ est un bon témoin négatif car aboutit à une faible intensité de fluorescence (environ 500 u.a.) pour les deux sialylglycoconjugués contre environ 6000 et 4000 u.a. respectivement pour 3'-SL et 6'-SL, après hydrolyse par les NA du virus H₃N₂.

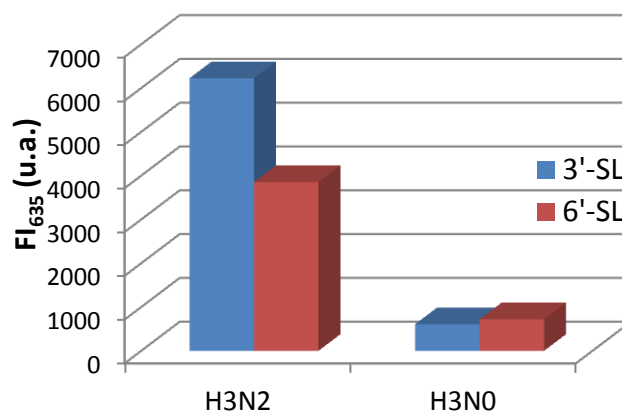


Figure 5-15 Comparaison de la digestion de 6'-SL et 3'-SL par les NA du virus humain de la grippe H₃N₂ et du virus mutant H₃N₀ à 8.10⁷ TCID₅₀/mL. D'après (Pourceau et al. 2011)

Suite à cette hypothèse confirmée, on a cherché à limiter l'adsorption non spécifique observée en testant différents temps de lavage. On a testé, après reconnaissance avec la lectine RCA₁₂₀, des lavages au PBS-T₂₀ 0.05% pendant 1 ou 10min (*Figure 5-16*). Peu de fluorescence est observé avant 90min puis une forte augmentation jusqu'à 60% de digestion après 300min. Ainsi, d'augmenter le temps de lavage permet de bien éliminer les débris non désirés portant des résidus galactosyle à la surface du glycoarray et donc de diminuer l'adsorption non spécifique.

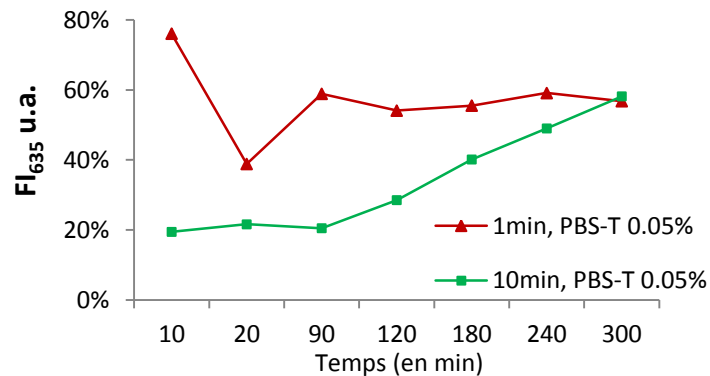


Figure 5-16 Deux temps de lavage de lame testés (1min et 10min) après l'étude cinétique de la digestion du 6'-SL par les NA d'H₃N₂ à 8.10⁶ TCID₅₀/ml. (Pourceau et al. 2011)

De cette étude nous pouvons conclure que les deux techniques (par glycoarray et MALDI-TOF) ont permis de déterminer rapidement l'activité enzymatique et la spécificité de la neuraminidase (NA). Les deux virus (humain H₃N₂ et aviaire H₅N₂) présentent une activité enzymatique pour les sialylactoconjugués α -2,6-sialylglycoconjugué (**6'-SL**) et α -2,3-sialylglycoconjugué (**3'-SL**). Néanmoins la NA du virus humain est plus active que celle du virus aviaire. De plus, il y a une spécificité des NA des deux virus pour le 3'-SL car ils hydrolysent plus vite de sialylglycoconjugué. Les résultats de ces deux études sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Carbain et al. 2009; Katinger et al. 2004; Mochalova et al. 2007; Mochalova et al. 2005). En outre, comme attendu, le taux d'hydrolyse diminue avec la diminution du titre du virus. Enfin, nous avons remarqué que laver les lames pendant 10min au lieu de 1min avec PBS-T_{20-0.05%} après reconnaissance du galactose par la lectine RCA₁₂₀ permettait de limiter l'adsorption non spécifique du virus à la surface de la biopuce.

Chapitre 6

Adaptation de la méthode DDI sur une surface d'or

Dans ce sixième chapitre nous présentons les premiers travaux sur l'adaptation de la méthode DDI sur une biopuce à surface d'or afin de pouvoir utiliser, à terme, des systèmes de détection sans marquage des interactions.

6.1. Introduction

Dans la littérature, les interactions glycocluster/lectines sont le plus souvent étudiées par spectroscopie de fluorescence avec marquage préalable du matériel biologique. C'est d'ailleurs cette technique que nous avons utilisé au cours de toutes les études présentées auparavant. Elle présente l'avantage d'être sûr que l'interaction mesurée correspond bien à l'entité biologique recherchée. Par contre, c'est une lecture en point final et elle nécessite une étape de marquage. Il existe des méthodes alternatives de détection sans marquage qui permettent de s'affranchir de cette étape de marquage pouvant éventuellement altérer les propriétés de certaines entités biologiques. Aussi, un des objectifs de l'équipe a été de mettre en place un système de détection par résonance des plasmons de surface (SPR) et en parallèle de développer des glycoarrays adaptés à cette technique de mesures afin d'étudier en temps réel les interactions lectine/glycocluster. Ainsi il sera possible de mesurer des K_d par SPR et de les comparer avec les valeurs obtenues par fluorescence. Cependant, les mesures par SPR nécessitent une surface métallique (or) déposée en couche mince (45-50 nm) à la surface d'un matériau. Pour conserver le pouvoir de contrôler la densité, ainsi que l'orientation des sondes à la surface du capteur, tel que nous l'avons fait jusqu'à présent, nous devons donc adapter la méthode DDI à une surface d'or fonctionnalisée. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la formation contrôlée d'une monocouche auto-assemblée de thiols sur une surface métallique (formation de SAM). Afin de mettre en place un protocole bien établi permettant d'obtenir des glycoarrays fiables de manière reproductible, nous devons optimiser chaque étape de préparation du support. Ainsi l'objectif est donc de tester plusieurs

prétraitements de surface, plusieurs fonctionnalisations de surface : SAM simples ou mixtes, afin de déterminer la chimie de surface optimale pour étudier les interactions lectine/glycocluster par DDI sur une surface d'or.

Dans un premier temps, nous allons expliquer ce qu'est une SAM simple et une SAM mixte. Puis nous présenterons l'influence des différents prétraitements avant de présenter l'effet de la fonctionnalisation de surface sur l'immobilisation par DDI des glycoclusters à la surface de la biopuce.

6.2. Les SAM (Self Assembled Monolayers)

6.2.1. Qu'est-ce qu'une SAM

Les SAM sont des couches auto-organisées de molécules. Dans le cas des biocapteurs, cette couche doit créer le lien entre la surface du transducteur (or) et la biomolécule à immobiliser. En général ce sont des molécules organiques qui présentent une fonction chimique différente à chacune de leurs extrémités (*Figure 6-1*). L'une doit présenter une forte affinité pour la surface d'or (formation de la liaison S-Au par chimisorption dans notre cas) et l'autre doit comporter un groupement fonctionnel permettant de greffer une molécule biologique (un acide carboxylique qui va pouvoir réagir avec une amine de la protéine par exemple pour former une liaison amide).

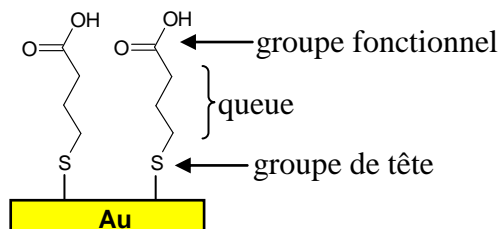


Figure 6-1 Représentation de la liaison or-thiol

Des surfaces homogènes peuvent être réalisées par auto-assemblage de monocouches organiques (*Figure 6-2*). L'auto-assemblage, ou formation spontanée de structures hiérarchiques complexes à partir de briques simples, est un phénomène omniprésent dans la nature. Il gouverne la formation des parois cellulaires ainsi que le repliement des protéines. Lorsque ce processus se produit à l'interface solide/liquide, par adsorption de molécules tensioactives à partir d'une solution, il donne lieu à des assemblages moléculaires bidimensionnels qui peuvent être très ordonnés (Love et al. 2005; Wink et al. 1997).

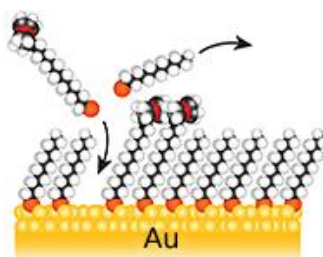


Figure 6-2 Représentation d'une SAM. En jaune sont représentées les molécules d'or, en rouge les molécules de soufre, en noir le carbone et en blanc les hydrogènes

Les thiols (composés organiques comportant un groupement thiol : -SH attaché à un atome de carbone) sont structurellement similaires aux alcools mais leurs propriétés chimiques sont différentes. Les thiols sont plus nucléophiles, plus acides et plus facilement oxydés. La différence d'électronégativité entre l'atome de soufre (2,58) et l'atome d'hydrogène (2,20) est petite ce qui empêche toute liaison hydrogène de se former. En infrarouge, les thiols sont remarquables par l'existence d'une bande assez faible vers 2560 cm^{-1} .

Les composés organosulfurés tels les alcanethiols ont une très forte affinité avec différents métaux (or, argent, platine ou cuivre). Par exemple, l'énergie de la liaison Au-S est de l'ordre de $100\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Il est important de noter que cette liaison est réversible. Néanmoins l'énergie des liaisons S-S, suivant les cas, est comprise entre 265 et $430\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ il est donc nécessaire de faire attention à la formation des ponts disulfures. D'autre part, la structure de la SAM dépend de la morphologie du métal et de sa cristallinité. L'or Au(111) est le plus couramment utilisé car il est inerte et, de plus, les films déposés sur l'or adoptent cette orientation cristallographique (Wink et al. 1997).

Les thiols peuvent être adsorbés directement sur la surface d'or grâce à des solvants de haute pureté (éthanol absolu ou eau en fonction de la polarité des alcanethiols utilisés). La formation de la SAM se passe en deux temps : le temps d'adsorption et le temps d'organisation des molécules à la surface. Le temps d'adsorption semble être indépendant de la longueur de la chaîne. Néanmoins, le temps d'organisation de la SAM est diminué lors de l'utilisation de solutions concentrées. Une solution diluée d'alcanethiols peut former une monocouche dense en moins d'une heure (Wink et al. 1997).

6.2.2. SAM simple

La SAM simple consiste en l'auto-organisation, sur une surface métallique, d'une monocouche d'un seul type de thiol. A la Figure 6-3 se trouve un exemple de SAM simple avec le thiol noté thiol 2 dans le chapitre 2 : $\text{HS-C}_{11}\text{-EG}_3\text{-COOH}$. Le groupement fonctionnel est un acide carboxylique pouvant réagir avec une amine pour former une liaison amide.

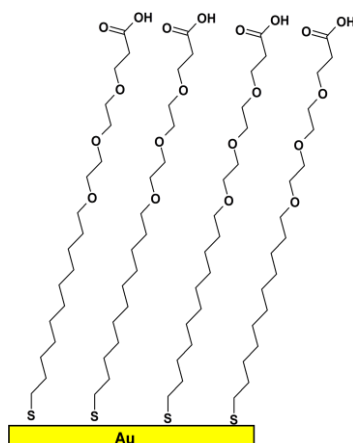


Figure 6-3 Représentation d'une SAM simple sur or avec le thiol $HS-C_{11}-EG_3-COOH$

6.2.3. SAM mixte

La SAM mixte consiste en l'organisation, sur une surface métallique, d'une monocouche auto-assemblée de deux types de thiol. Souvent un thiol possédant le groupe fonctionnel désiré et l'autre thiol utilisé en tant qu'agent intercalant et/ou permettant d'éviter les adsorptions non spécifiques grâce à des groupements éthylène glycol (EG) par exemple. A la Figure 6-4 se trouve un exemple de SAM mixte avec les thiols notés thiol 2 et 4 dans le chapitre 2 : $HS-C_{11}-EG_3-COOH$ et $HS-C_{11}-EG_3-OMe$. Le groupement terminal $-OMe$ ne réagira pas avec l'amine mais ce dernier s'intercale entre les groupements fonctionnels acide carboxylique afin de les éloigner les uns des autres et de les rendre plus accessibles.

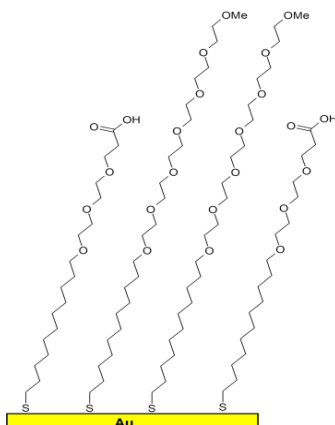


Figure 6-4 Représentation d'une SAM mixte sur or avec les thiols $HS-C_{11}-EG_3-COOH$ et $HS-C_{11}-EG_3-OMe$

L'or nu permet un auto-assemblage de molécules pourvues de fonctions thiols. Le choix d'une telle surface entraîne la détection d'un grand nombre d'interactions non spécifiques résultant de l'adsorption des analytes sur le support métallique. Une étape de passivation de la surface avec une solution de mercaptoéthanol est donc indispensable pour réduire ce phénomène (Rella et al. 2004).

Plusieurs publications présentent des protocoles de greffages différents. L'équipe de Li *et al* utilise un mélange éthanol/eau pour la formation des OEG-SAMs ce qui permet d'obtenir une plus forte densité de SAMs sur la surface d'or par rapport à l'utilisation d'une solution d'éthanol pure (Li et al. 2005). Dhayal *et al* ainsi que pour Briand *et al*, ont joué sur la longueur des chaînes thiols pour augmenter l'accessibilité de la cible sur la sonde (Briand et al. 2006; Dhayal and Ratner 2009). Plusieurs revues de la littérature récapitulent l'ensemble des techniques d'immobilisation (Homola et al. 1999; Love et al. 2005; Samanta and Sarkar 2010; Wink et al. 1997). Toutefois, nous nous sommes focalisés sur la formation de SAM adaptée pour réaliser une immobilisation par DDI.

Concernant la densité de surface, ajouter du $MgCl_2$ à la solution de spotting permet de limiter les répulsions électrostatiques de l'ossature phosphatée de l'ADN et ainsi, d'obtenir une densité de sondes suffisamment élevée d'après Kick *et al* (Kick et al. 2010).

Ainsi, nous avons débuté ce travail par l'étude de l'effet du prétraitement sur la formation d'une SAM. Puis nous avons testé la formation de plusieurs SAM : SAM simples, SAM mixtes et analysé les surfaces à l'issue de chaque fonctionnalisation afin de déterminer la fonctionnalisation chimique optimale. Enfin nous avons testé l'immobilisation d'un simple brin d'ADN sur la surface afin de préparer le biocapteur à une immobilisation dirigée par l'ADN (DDI).

6.3. Effet du prétraitement (Piranha, Plasma O_2 ou Ozone O_3) sur le substrat

Avant l'étape de formation de la SAM, il est important de réaliser une étude comparative de différents prétraitements de surface. Pour rendre la surface hydrophile, la surface doit être nettoyée. Nous avons décidé de tester trois traitements différents :

- au piranha : plonger l'échantillon d'or nu dans une solution acide de « piranha » (2/3 de H_2SO_4 à 96% et 1/3 de H_2O_2) d'après (Bombera et al. 2012; Kick et al. 2010; Zhi et al. 2008). Le mélange « piranha » est très corrosif générant in-situ de l'acide de Caro et peut réagir violemment avec des composés organiques.
- au plasma O_2 : l'échantillon d'or nu est passé sous un flux de plasma O_2 (Briand et al. 2006; Pillet et al. 2010).
- à l'ozone O_3 : l'échantillon d'or nu est passé sous un flux UV d'ozone O_3 e (Dhayal and Ratner 2009).

Nous avons caractérisé la surface d'or après chaque traitement par plusieurs types d'analyse de surface : XPS (spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X), DDX (diffractométrie de rayons X), angle de contact.

6.3.1. Caractérisation des prétraitements par XPS

L'XPS nous informe quant à la composition chimique de surface du matériau sur 10nm. La *Figure 6-5* présente les spectres larges des échantillons d'or non traités (servant de référence) et ceux traités au piranha, à l'ozone et au plasma oxygène.

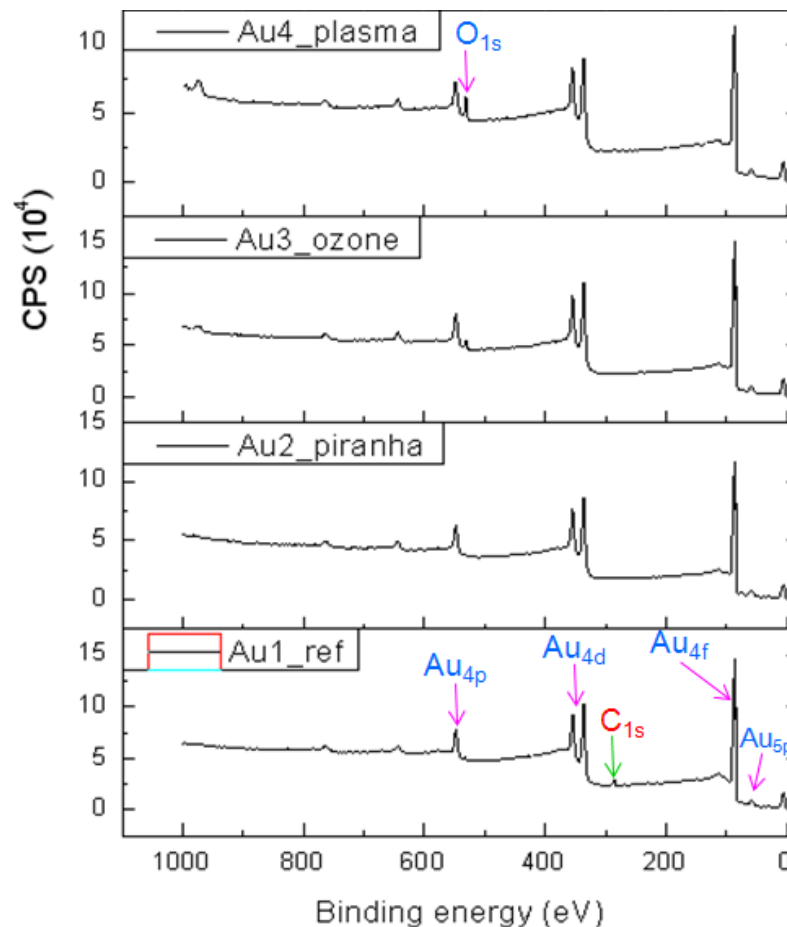


Figure 6-5 Spectre large des surfaces traitées au piranha, à l'ozone O₃ et au plasma O₂. Echantillon d'or non traité (ref)

Sur tous les spectres, l'ensemble des pics de photoélectrons imputables à l'or (Au_{4p}, Au_{4d}, Au_{4f} et Au_{5p}) sont observés. Sur le spectre de la référence se trouve le pic du carbone (C_{1s}) caractéristique d'une surface sale. Après traitement des surfaces par les trois techniques le pic du carbone a disparu, signifiant que les surfaces ont bien été nettoyées. De plus, pour le traitement de l'or par plasma O₂, le pic de l'oxygène (O_{1s}) est apparu. De même pour le traitement ozone mais beaucoup plus faible. Nous pouvons expliquer ce résultat par le fait que

la surface métallique a été oxydée. Néanmoins cet oxyde d'or n'est pas stable et disparaît dans le temps.

6.3.2. Caractérisation des prétraitements par DDX

La DDX nous informe quant à la cristallinité, la composition chimique et la rugosité de la surface d'or et son épaisseur sur la lame de verre. La *Figure 6-6* présente les spectres larges $\theta/2\theta$ des échantillons d'or non traités (servant de référence) et ceux traités au piranha, à l'ozone et au plasma oxygène. Il s'avère que nos échantillons sont principalement constitués d'or 111 car nous observons un grand pic caractéristique de l'arrangement 111. Le traitement n'a donc aucun effet sur l'orientation cristalline.

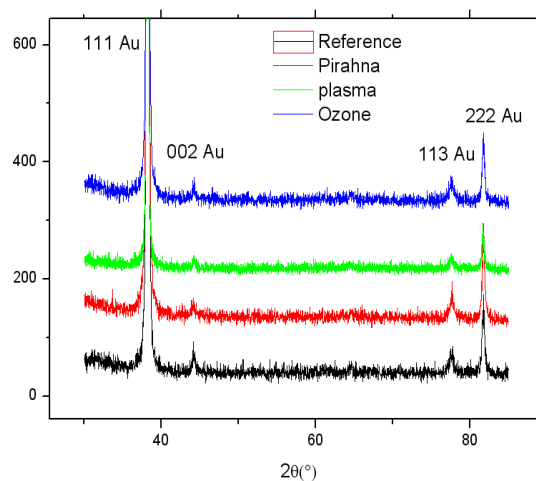


Figure 6-6 Spectre $\theta/2\theta$ par DDX des surfaces traitées au piranha, à l'ozone O_3 et au plasma O_2 . Echantillon d'or non traité (référence)

La *Figure 6-7* présente les spectres en réflectivité des échantillons d'or traités au piranha, à l'ozone et au plasma oxygène. Après calcul de l'épaisseur de la couche d'or par « fit » des spectres de réflectivité, l'épaisseur d'or est constante à 50 nm. Néanmoins, nous remarquons que la périodicité des courbes varie en fonction du traitement. La périodicité est reliée à la rugosité de la surface donc les traitements n'influent pas sur l'épaisseur mais sur la rugosité de la surface d'or. Plus la périodicité est élevée, moins la surface est rugueuse. Ainsi, le traitement au plasma O_2 (surface bombardée par l'oxygène) rend la surface d'or plus rugueuse comparée aux autres traitements (traitement chimique en solution ou sous flux UV O_3).

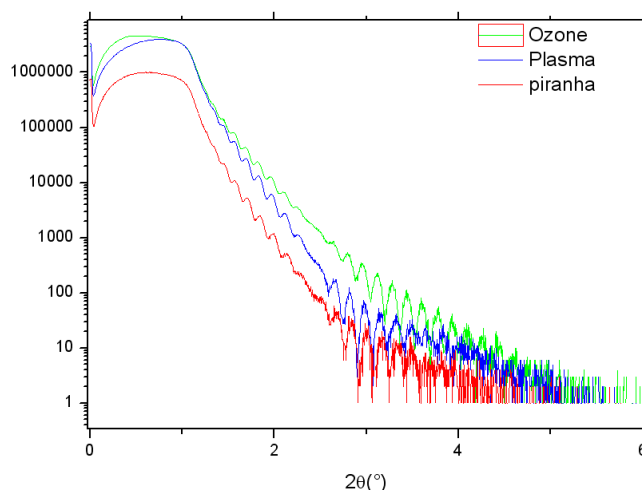


Figure 6-7 Spectre en réflectivité par DDX des surfaces traitées au piranha, à l'ozone O_3 et au plasma O_2 . Echantillon d'or non traité (référence)

La dernière analyse par DDX correspond à la figure de pôle de la surface. Il s'agit de faire varier θ de 0° à 360° puis d'observer l'orientation cristalline de l'or. La Figure 6-8 présente la figure de pôle de notre échantillon d'or nu. Cette analyse, nécessitant 1 nuit à réaliser et ne permettant pas de discriminer un traitement, a été effectuée sur l'échantillon d'or de référence. Le cercle central représente le pic de l'or 111. La couronne plus claire en périphérie nous informe que notre échantillon d'or est constitué d'atomes d'or orientés 111 par cubes mais il n'y a pas qu'une seule orientation de ces cubes dans le plan.

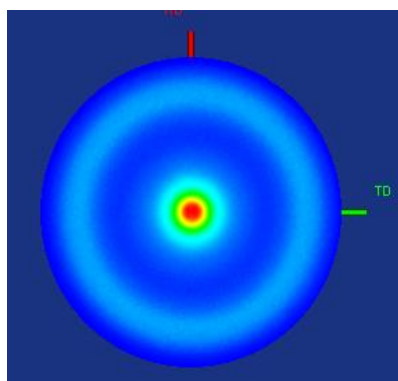


Figure 6-8 Figure de pôle par DDX de l'échantillon d'or non traité (référence).

6.3.1. Caractérisation des prétraitements par angle de contact

L'angle de contact nous informe quant à la mouillabilité d'une surface d'un échantillon. Le Tableau 6-1 présente les mesures d'angle de contact des échantillons d'or en fonction du solvant de mesure utilisé. Ainsi il a été possible de calculer les valeurs d'énergie de surface pour chaque échantillon.

		Pré-traitement des lames d'or			
		Au-Ref	Au-Piranha	Au-Plasma O ₂	Au-Ozone
		θ°	θ°	θ°	θ°
Solvent 1	Eau	83,1	15,9	16,7	16,2
Solvent 2	Diiodométhane	43,5	7,3	8,6	7,9
Solvent 3	Ethylèneglycol	50,4	41,9	47,8	46,2
	Energie de surface totale: γ_s (mJ.m ⁻²)	39,9	63,7	66,5	65,6
	Composante polaire: γ_s^p (mJ.m ⁻²)	2,8	33,0	32,1	33,3
	Composante dispersive: γ_s^d (mJ.m ⁻²)	37,1	30,7	34,3	32,2

Tableau 6-1 Mesure des angles de contact des surfaces traitées au piranha, à l'ozone O₃ et au plasma O₂. Echantillon d'or non traité (Au-ref)


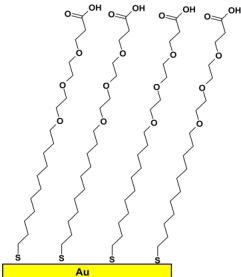
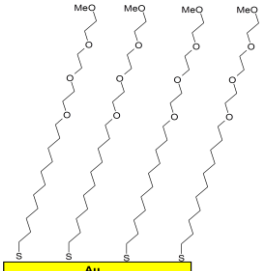
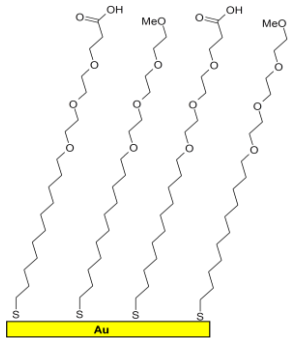
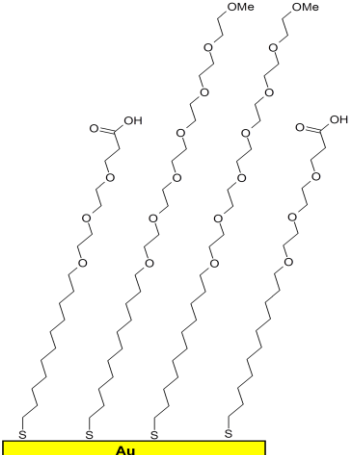
L'or nu non nettoyé (sale) présente en général un angle de contact avec le solvant aqueux de l'ordre de 80° et lorsqu'il est propre de l'ordre de 10° (Dubiel et al. 2011). Nous confirmons ces valeurs car nous obtenons un angle de contact de 83.1° pour notre référence (notée Au-Ref dans *Tableau 6-1*) et autour de 16° après les trois traitements signifiant que ces derniers sont tous les trois des traitements efficaces comme observé par XPS. L'utilisation de trois solvants (eau, éthylène glycol, diiodométhane) a pour but de déterminer les énergies de surface totales, les composantes polaires et dispersives des différents échantillons grâce à l'utilisation du modèle d'Owens Wendt : $\gamma_l [1+\cos(\theta)] = 2 \gamma_{ld}$, avec γ_l et γ_{ld} respectivement les énergies de surface liquide-air et de l'interface solide-liquide. Une surface propre, d'énergie de surface de l'ordre de 65 mJ.m², tend naturellement à adsorber des impuretés afin de réduire son énergie de surface. Ainsi, après traitement, la surface d'or est très hydrophile et très réactive et il est important d'enchaîner rapidement avec l'étape de formation de la SAM dans une solution de thiol dissoute dans l'éthanol.

6.3.2. Conclusion générale sur les prétraitements

Cette étude sur les différents prétraitements nous a permis de choisir, un traitement de surface parmi les trois traitements testés. Pour la suite de cette étude sur l'adaptation de la méthode DDI sur une surface d'or c'est le lavage au piranha qui a été privilégié. Les différentes analyses de surfaces effectuées (XPS, DRX, angle de contact) nous ont confirmé que les trois traitements étaient efficaces, néanmoins, le piranha n'oxyde pas la surface d'or et permet de conserver une surface dont la rugosité n'est pas affectée.

6.4. Fonctionnalisation chimique de la surface

Après le prétraitement de la surface, la lame d'or est directement plongée dans une solution de thiols à 2mM dans l'éthanol afin de former les SAM. Sept échantillons ont été préparés avec des caractéristiques résumées sur le *Tableau 6-2*. Les réactions ont été décrites dans le *Chapitre 2*. Puis les différents échantillons ont été analysés par des analyses de DDX, d'angle de contact et d'ellipsométrie.

Echantillon	Description	Représentation
1	Au-Ref	
2	SAM avec thiol n°2	
3	SAM avec thiol n°4	
4	SAM mixte avec thiols n°2 et 4	
5	SAM mixte avec thiols n°2 et 3	

6	SAM mixte avec thiols n°2 et 4 + activation avec le NHS	
7	SAM mixte avec thiols n°2 et 4 + activation + ODN-NH₂	

Tableau 6-2 Tableau récapitulatif des différents échantillons (SAM simples et mixtes) réalisés

6.4.1. Caractérisation de la fonctionnalisation par angle de contact

Le Tableau 6-3 présente les mesures d'angle de contact des différents échantillons avec le solvant aqueux.

Formation des SAM						
	Ech n°1 = Au-Ref	Ech n°2 = SAM thiol 2	Ech n°3 = SAM thiol 4	Ech n°4 = SAM des thiols 2+4	Ech n°5 = SAM des thiols 2+4+activation	Ech n°7 = SAM des thiols 2+4+ activation + ODN-NH ₂
	θ°	θ°	θ°	θ°	θ°	θ°
Eau	78,3	33,3	54,1	44	28,4	56,4
Eau	75,5	27,9	61,3	49,3	23,9	55,3
Eau	70,2	20,7	52,1	44,3	28,7	53,1
Moyenne	74,7	27,3	55,8	45,9	27,0	54,9

Tableau 6-3 Mesure des angles de contact des échantillons 1 à 7

Les valeurs d'angle de contact nous donnent des informations sur l'hydrophobicité. Plus l'angle de contact est élevé, plus la surface est hydrophobe (Dubiel et al. 2011). Ainsi, il y a confirmation que l'échantillon **2**, simple SAM avec des acides carboxyliques $-\text{COOH}$, était bien hydrophile ($\theta_2 = 27.3^\circ$). Au contraire, l'échantillon **3**, simple SAM avec des éthers $-\text{OMe}$, était bien hydrophobe ($\theta_3 = 55.8^\circ$). Concernant la SAM mixte (échantillon **4**), l'angle de contact est compris entre θ_2 et θ_3 : $\theta_4 = 45.9^\circ$ valeur attendue compte tenu de la mixité des groupements fonctionnels en surface. Puis l'activation de la SAM mixte a rendu la surface plus hydrophile qu'elle ne l'était car $\theta_5 = 27^\circ$. Enfin, la formation de la liaison amide, afin d'immobiliser l'ODN par liaison covalente, a rendu la surface plus hydrophobe car $\theta_7 = 54.9^\circ$. Nous avons toutefois été surpris car suite à l'ajout de l'ODN, chargé négativement, nous nous attendions à obtenir une surface relativement plus hydrophile que la surface de l'échantillon n°4, c'est-à-dire avoir un $\theta_7 < 45.9^\circ$. Nous pouvons nous demander si l'ODN est bien lié de manière covalente à la surface. Une perspective serait de réitérer cette fonctionnalisation en modifiant les conditions d'activation des acides carboxyliques. Par exemple, activer l'acide avec du NHS/EDC dans un solvant aqueux en diminuant le temps d'activation à 30 minutes au lieu de faire la réaction pendant une nuit. En effet, sur la nuit, dans l'eau, il est possible que l'ester activé soit hydrolysé en N-acylurée. Ainsi, diminuer le temps d'activation dans l'eau éviterait d'aboutir à cette hydrolyse (Sam et al. 2010; Wang et al. 2011). Ou bien, il serait intéressant d'activer l'acide avec du NHS/EDC non plus dans un solvant aqueux mais un solvant organique type THF. En effet, une étude par spectroscopie Infrarouge (PMIRRAS) sur surface d'or est en cours par Palazon *et al.* sur l'étude de l'effet du solvant, de la concentration et du temps d'activation des acides carboxyliques de la SAM. A ce jour, il semblerait que le NHS/EDC dans le THF permette d'activer les acides carboxyliques et que l'efficacité de l'activation augmente avec le temps de réaction. Les analyses par DDX et par Ellipsométrie présentées ci-dessous nous apportent de nouvelles informations.

6.4.2. Caractérisation de la fonctionnalisation par DDX

La *Figure 6-9* présente les spectres en réflectivité de la surface d'or traitées au piranha (échantillon **1**), de la surface avec la SAM mixte (échantillon **4**) et de la surface avec la SAM mixte avec l'ADN (échantillon **7**). Nous remarquons très nettement que les courbes en rouge (échantillon **1**) et bleu (échantillon **4**) n'ont pas la même périodicité. La courbe en bleu a une périodicité plus faible signifiant que la couche de SAM est bien organisée à la surface de la lame d'or. Par contre pour l'échantillon **7** correspondant à la SAM mixte avec

l'ADN, la courbe en vert présente une périodicité plus élevée et une pente plus importante signifiant que la surface est moins rugueuse qu'avant fonctionnalisation avec l'ADN. Nous pouvons supposer qu'une couche d'ODN est adsorbée horizontalement sur la surface. Il est à noter que l'ODN présente une flexibilité plus importante que deux brins hybridés, ainsi, sur une surface, il est probablement plus difficile de mesurer l'épaisseur d'une couche d'ODN car elle n'est pas organisée ni arrangée à la surface du matériau.

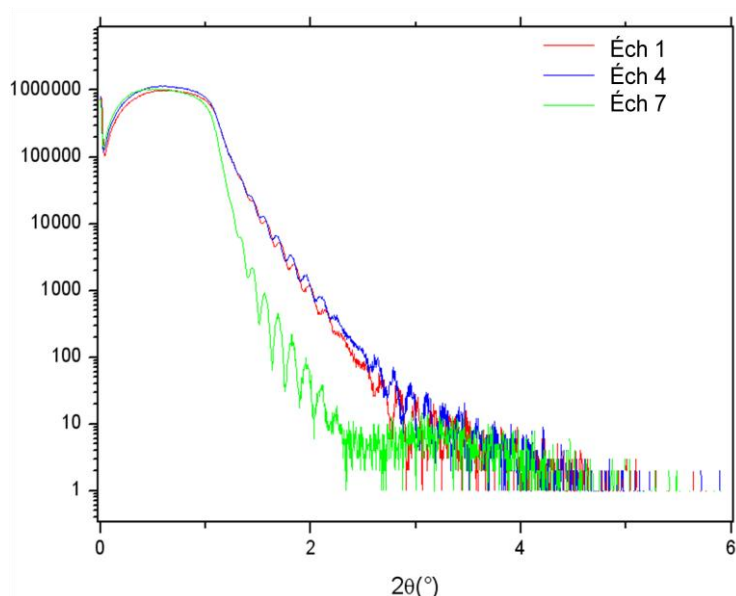


Figure 6-9 Spectre en réflectivité par DDX des échantillons 1 (Au-Ref), 4 et 7

Après calcul des épaisseurs des différentes couches par « fit » des spectres de réflectivité de la Figure 6-9, les différentes valeurs ont été regroupées dans le Tableau 6-4. Ces valeurs mesurées nous renseignent sur l'épaisseur des différentes couches constituant la surface d'or avant activation.

	Formation des SAM		
	Ech n°1 = Au-Ref	Ech n°4 = SAM des thiols 4+6	Ech n°6 = SAM des thiols 4+6 + activation + ODN-NH ₂
Verre	1 mm	1 mm	1 mm
Chrome	2 nm	2 nm	2 nm
Epaisseur d'or	50,7 nm	50,7 nm	50,7 nm
Epaisseur de la SAM mixte	/	2 nm	2 nm
Epaisseur de la SAM mixte + ODN-NH₂	/	/	1.5 nm

Tableau 6-4 Mesure des épaisseurs des différentes couches à la surface du glycoarray par DDX pour les échantillons n°1 (Au-Ref), 4 et 6.

L'épaisseur de la couche d'or a été confirmée à 50,7nm puis l'épaisseur de la couche de SAM mixte à la surface de la lame est de 2nm et enfin l'épaisseur de la couche d'ADN liée à la SAM mixte est trouvée de: 1.5 nm. Cette dernière valeur nous semble cohérente avec des ODN, constitués de 18 nucléotides.

6.4.3. Caractérisation de la fonctionnalisation par ellipsométrie

Le *Tableau 6-5* présente les mesures par ellipsométrie des épaisseurs des différentes couches à la surface du glycoarray pour les échantillons n°1, 4 et 7. L'ellipsométrie est une technique optique de caractérisation et d'analyse de surface.

	Formation des SAM		
	Ech n°1 = Au-Ref	Ech n°4 = SAM des thiols 4+6	Ech n°7 = SAM des thiols 4+6 + activation + ODN-NH ₂
Epaisseur d'or	51,4	51,4	51,4
Epaisseur de la SAM mixte	0	2,614	1,18
Epaisseur de la SAM mixte + ODN-NH₂	0	0	4,69

Tableau 6-5 Mesure des épaisseurs (en nm) des différentes couches à la surface du glycoarray par ellipsométrie pour les échantillons n°1 (Au-Ref), 4 et 6.

Les valeurs mesurées nous renseignent sur l'épaisseur des différentes couches constituant la surface d'or avant activation. L'épaisseur de la couche d'or a été confirmée à 51,4 nm puis l'épaisseur de la couche de SAM mixte à la surface de la lame est trouvée égale à : 1,18nm et enfin l'épaisseur de la couche d'ADN liée à la SAM mixte mesurée à 4,69 nm. Cette dernière valeur nous semble élevée sachant que le simple brin d'ADN immobilisé est un ODN à 18 nucléotides donc, même bien droit à la surface de la lame, ce qui n'est certainement pas le cas, il ne devrait pas dépasser 1 à 2 nm environ. En effet, la distance entre 2 nucléotides (A, T, C ou G) est de l'ordre de 3,4 Å. Il est toutefois à noter que ce modèle ne tient pas compte des hétérogénéités. D'autre part, la flexibilité de l'ODN engendrerait la formation d'amas d'ODN à la surface, disposés en multicouches. Cette valeur (4.69 nm) ne concorde pas avec celle déterminée par DDX (1.5 nm). De plus, l'immobilisation d'un simple brin d'ADN sur une lame de verre a été étudiée par AFM. Il est apparu que les ODN ne formaient pas d'agrégats sur la surface activée au NHS (Dugas et al. 2004). D'autre part, l'épaisseur est calculée à partir d'une valeur de permittivité correspondant à une couche complète. Si cette valeur n'est pas correcte, ou la couche incomplète, on peut surestimer l'épaisseur. Nous pouvons conclure que le modèle choisi pour la mesure par ellipsométrie ne

semble pas optimum. Il serait donc intéressant de réitérer cette mesure en optimisant le modèle utilisé.

6.5. Conclusion sur la fonctionnalisation d'une surface d'or

Pour conclure sur ce travail préliminaire, plusieurs points expérimentaux ont été étudiés. Plusieurs prétraitements de surface des lames d'or industrielles d'épaisseur d'or d'environ 50nm ont été réalisés : piranha, plasma O₂ ou ozone. Il s'avère que les trois prétraitements ont été efficaces. Néanmoins nous avons choisi de traiter nos lames au piranha car cette méthode chimique n'oxyde pas l'or et permet d'obtenir une surface moins rugueuse par rapport au bombardement de l'or sous plasma O₂ ou ozone.

Dans un deuxième temps, plusieurs SAM ont été testées : simples ou mixtes. Nous avons choisi de réaliser pour la suite des SAM mixtes et de tester plusieurs méthodes d'activation des acides carboxyliques de surface en relation avec les résultats reportés dans la littérature (Dhayal and Ratner 2009) car nos analyses par ellipsométrie, angle de contact et DRX sont encore incomplètes, faute de temps. Ainsi, nous avons effectué la biofonctionnalisation des SAM mixtes par immobilisation d'un simple brin d'ADN (réaction d'amidation des ODN-NH₂) après activation des acides carboxyliques au NHS dans l'eau. En outre, caractériser plus en détail l'étape d'activation par PMIRRAS et XPS nous semble important car cette étape est sine qua non dans l'immobilisation par DDI. Il est important de déterminer si les brins d'ADN sont bien liés de manière covalente à la SAM ou s'ils sont juste adsorbés à la surface en multicouche.

Les perspectives sur ce travail sont nombreuses. En effet, il reste encore beaucoup de caractérisation de surface à entreprendre avant de tester l'hybridation de glycoclusters par DDI puis d'étudier les interactions glycoclusters/lectine en solution et en temps réel par SPR.

CONCLUSION GENERALE

et PERSPECTIVES

Cette thèse a porté sur le développement d'une plateforme de criblage (appelée glycoarray) pour la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses. Une partie importante a été consacrée à l'identification (analyse qualitative) et la comparaison (analyse quantitative) de l'affinité entre une bibliothèque de glycoclusters synthétiques vis-à-vis de trois lectines de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (les lectines PA-II, PA-III et FliD). FliD est une lectine flagellaire impliquée dans le stade précoce de l'infection de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) sur les parois pulmonaires des patients immunodéprimés (par exemple les patients atteints de la mucoviscidose). FliD est une lectine spécifique des sucres type Lewis^x. PA-II et PA-III sont des lectines solubles, tétravalentes et respectivement spécifiques du galactose et du fucose. Ces lectines n'interviennent que plus tard dans le stade infectieux de la bactérie, une fois le biofilm formé. Ces trois lectines sont des facteurs de virulence, ainsi, il est intéressant de trouver des leurres moléculaires à partir de sucres synthétisés chimiquement, qui possèderaient une meilleure affinité que les sucres naturels vis-à-vis de ces lectines. Ces derniers seraient susceptibles d'empêcher / de perturber la formation ou la stabilité du biofilm dans l'espoir de rendre le pathogène plus vulnérable aux traitements antibiotiques. Ces molécules pourraient être à la base d'un nouveau traitement thérapeutique visant à empêcher la colonisation bactérienne des voies respiratoires du patient et donc, son infection chronique.

Ce système glycoarray a également été utilisé pour d'autres applications : sur une lectine de la bactérie opportuniste *Burkholderia ambifaria* (BambL, spécifique du fucose), sur une agglutinine toxique de *Viscum album* (VAA, spécifique du galactose), sur une galectine humaine h-Gal4, exprimée lorsqu'un individu est atteint d'un cancer du sein ou du foie, et enfin sur les neuraminidases du virus Influenza de la grippe.

Le microsystème d'analyse utilisé (glycoarray) est basé sur l'immobilisation dirigée des glycoclusters synthétiques via une hybridation de l'ADN (DDI). La détection des interactions s'est principalement faite par fluorescence. La méthodologie développée présente de nombreux avantages : plateforme réutilisable, limite de détection faible, densité d'immobilisation contrôlée via l'utilisation d'un premier fluorophore incorporé à la structure

du glycocluster, reconnaissance glycocluster/lectine pouvant se faire « sur puce » ou « en solution » avec une lectine marquée par un second fluorophore. Néanmoins, une détection sans marquage est en cours de développement afin de nous affranchir de cette étape de marquage qui peut altérer les propriétés biologiques et structurales des éléments biologiques étudiés.

Dans un premier temps, plusieurs séquences ADN ont été testées afin de déterminer celles permettant d'immobiliser simultanément plusieurs glycoclusters de manière homogène à la surface de la biopuce. L'étape d'immobilisation du glycocluster étant déterminante quant à l'efficacité du glycoarray, cette première étude, effectuée au préalable, a été décisive. Onze séquences d'ADN ont été choisies. Ainsi, les différents glycoclusters ont été synthétisés puis liés aux différents brins d'ADN préalablement sélectionnés et ne présentant pas de cross-hybridation. Ceci a rendu possible le multiplexage de l'analyse dans un puits de la lame microstructurée. En effet, 11 glycoclusters différents ont pu être mélangés en solution avec la lectine désirée puis les complexes glycocluster/lectine, formés en solution, ont pu être immobilisés, triés grâce à l'hybridation spécifique et sélective des brins d'ADN complémentaires puis détectés.

Dans un deuxième temps plusieurs techniques d'analyse sur glycoarray ont été développées afin d'étudier l'interaction glycocluster/lectine par lecture de la fluorescence : une analyse qualitative par lecture directe de la fluorescence (FI₆₃₅) et deux analyses quantitatives (IC₅₀ et la constante de dissociation K_d). L'IC₅₀ traduit la concentration en inhibiteur (I) nécessaire pour inhiber 50% de l'interaction entre le récepteur (L= Lectine) et son ligand (G= Glycocluster). Ainsi, plus un glycocluster possède une forte affinité avec une lectine, plus son IC₅₀ est grand. Et le K_d traduit la proportion de G et L sous forme complexée ou libre à l'équilibre. Ainsi, plus un glycocluster possède une forte affinité avec une lectine, plus son K_d est petit. La lecture de fluorescence directe (FI₆₃₅), apportant des informations qualitatives, est suffisante pour un dépistage rapide d'une bibliothèque de molécules. Néanmoins, elle doit être corroborée par des données quantitatives telles que les déterminations d'IC₅₀ et de K_d . Les mesures de K_d par glycoarray ont été vérifiées par les mesures effectuées par ITC des même glycoclusters. Il apparait que les deux analyses présentent des valeurs similaires. Nous avons toutefois remarqué que par glycoarray, en utilisant la méthode « en solution », les conditions de Langmuir, n'étaient pas toujours respectées selon le glycocluster étudié. Néanmoins, cette limite de validité peut-être

contournée, dans tous les cas, en utilisant la méthode « sur puce ». Une classification similaire des affinités selon les couples glycocluster/lectine étudiés a été trouvée par 3 méthodes indépendantes. Notons également qu'une comparaison avec une technique plus classique de mesure d'affinité (ITC), bien que très consommatrice de matériel biologique, a permis d'achever complètement la validation de nos méthodes.

Plusieurs applications d'étude glycocluster/lectine ont été réalisées. Deux bibliothèques de galactoclusters et de fucoclusters ont respectivement été testées vis-à-vis des lectines PA-IL et PA-III. Dans chaque bibliothèque, les glycoclusters varient en fonction du nombre de résidus terminaux (de 1 à 5, 8 ou 10), de leur arrangement spatial (linéaire en peigne ou antenne, à cœur centré hexose ou pentose, etc...), de leur charge (négative, neutre ou positive) et de la nature de leurs linkers L1 ou L2.

La lectine flagellaire de *Pseudomonas aeruginosa* FliD et l'agglutinine VAA ont également été testées sur la bibliothèque des galactoclusters. Seulement 2 galactoclusters semblent être reconnus par FliD, néanmoins la fluorescence à 635nm reste faible. Dans une perspective proche, il est prévu de tester de nouveaux glycoclusters portant des oligosaccharides de type Lewis^x.

Concernant VAA, il semblerait qu'elle possède une forte affinité pour le tétragalactocuster linéaire à cœur DMCH avec un linker L1 hydrophobe et un linker L2 aromatique.

Dans une autre partie, la lectine bactérienne BambL a été testée sur la bibliothèque des fucoclusters. Pour l'instant il semblerait que le Man(proTz EG₃-Fuc)₈ ait le plus d'affinité avec BambL. Une perspective serait de passer de 8 à 10 résidus par exemple et d'ajouter des charges positives ainsi que le groupement -Pe dans la structure.

En ce qui concerne l'étude sur les virus humains et aviaires de la grippe, il est apparu que les neuraminidases des deux types de virus présentaient une préférence marquée pour les glycoconjugués α -2,3-sialyllactose par rapport aux α -2,6-sialyllactose et que l'activité enzymatique des neuraminidases (NA) du virus humain de la grippe (H₃N₂) était supérieure à celle du virus aviaire de la grippe (H₅N₂).

En résumé, les études décrites dans cette thèse ont démontré que les glycoarrays microstructurés par un ensemble de micropuits avec une immobilisation des glycoclusters par DDI sont des outils efficaces et sensibles qui permettent d'effectuer des analyses qualitatives

et quantitatives fiables des interactions glycoclusters/protéine. En perspective de ce travail, nous pensons pouvoir encore améliorer ce type d'outils :

- 1) en augmentant la capacité d'analyse : en effet, nous devons constater que cette biopuce a été validée avec 8 glycoclusters différents analysés en parallèle néanmoins il est évident que ce système pourrait être amélioré en augmentant le nombre d'analyses en parallèle. Pour cela, il est nécessaire de posséder un ensemble plus vaste de séquences ADN capables de s'hybrider avec leurs séquences complémentaires respectives avec des rendements d'hybridation équivalents et sans cross hybridation.
- 2) en utilisant d'autres méthodes de détection pour lire une cinétique en temps réel des interactions. Au cours de ce travail, nous avons utilisé une détection basée sur le marquage par fluorescence mais celle-ci présente des limites lorsqu'il s'agit de conserver l'activité biologique des bactéries ou des virus. C'est pourquoi un travail d'adaptation à ce même concept miniaturisé par DDI-glycoarray a débuté avec autre type de transduction : la résonance de plasmons de surface (SPR) afin d'étudier les interactions glycoclusters/virus ou bactéries en s'affranchissant des étapes de marquage.

Enfin, ce travail de mesures des affinités par criblage est essentiellement expérimental. Il serait intéressant à partir des éléments réunis (importance de la topologie, de la charge, de la nature des linkers, de leurs longueurs respectives, du nombre de résidus...) de modéliser les différentes interactions en tenant compte des paramètres disponibles et ainsi de mieux appréhender ces mécanismes d'interactions.

ANNEXE : Structures développées des Glycoclusters

7.1. Bibliothèque des glycoclusters testés

Tous les glycoconjugués (glycoclusters) mentionnés dans cette thèse ont été synthétisés par nos collègues à l'IBMM de l'Université de Montpellier 2. Les procédures expérimentales de synthèse sont expliquées par Morvan et al. (Morvan et al. 2012). Nous présentons dans la figure ci dessous la structure générale des glycoclusters : galactomimétiques et fucomimétiques (également nommés galactoclusters et fucoclusters).

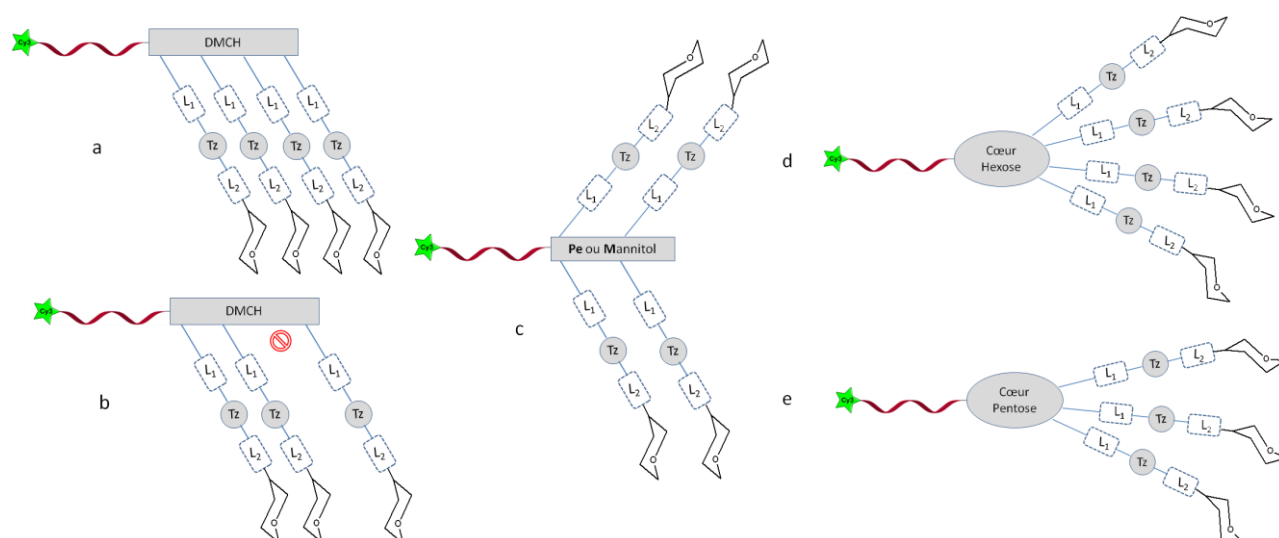


Figure 1 Structure générale des glycoclusters linéaires en peigne (a et b), anténés (c) et à cœur centré hexose (d) ou pentose (e) portés par un ADN-Cy3. L1=Linker 1 reliant le squelette phosphorylé (cœur) au triazole (Tz) et L2=Linker 2 reliant le triazole au résidu terminal

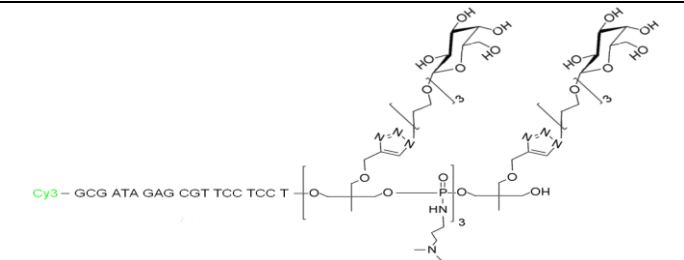
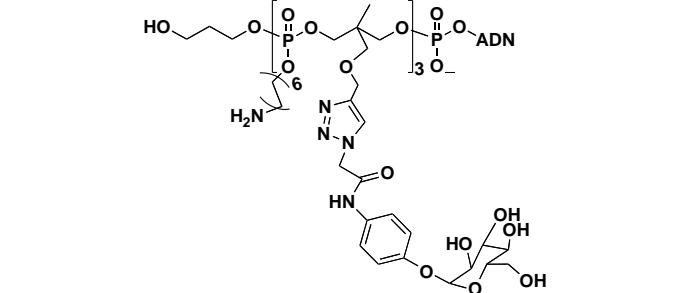
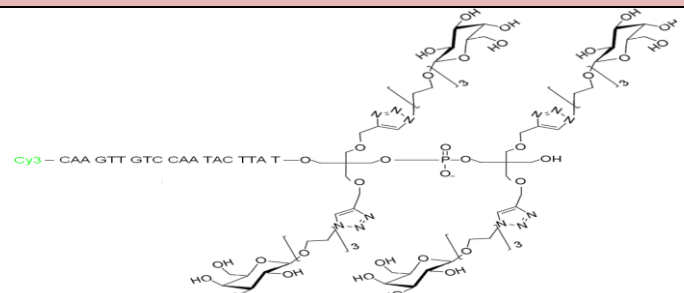
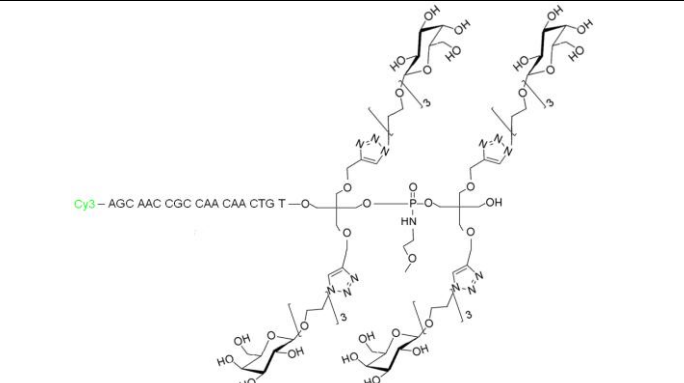
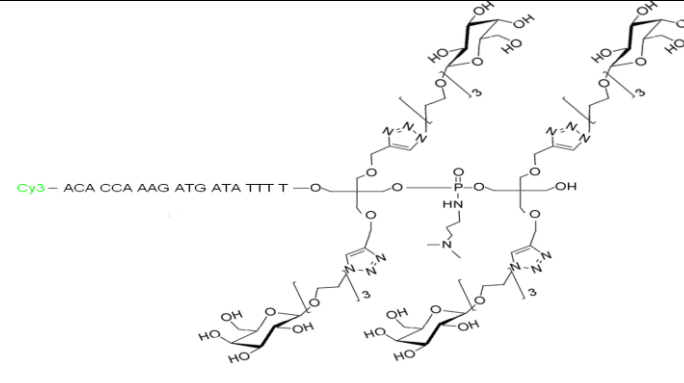
Tz= Triazole, DMCH=Diméthanolcyclohexane, Pe= Pentaerythritol

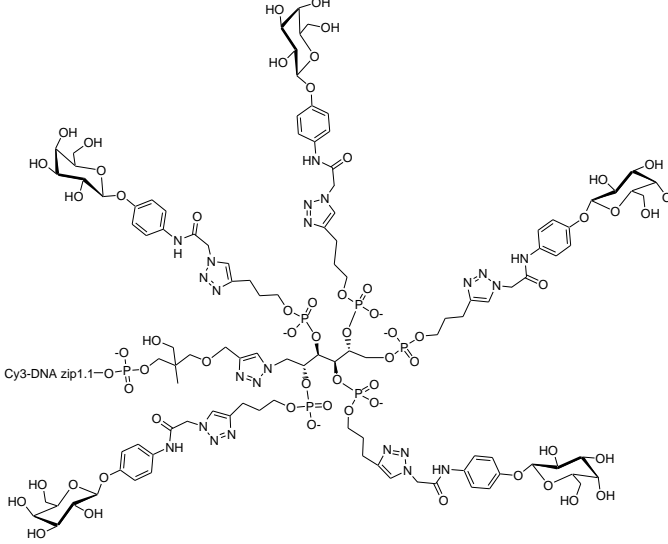
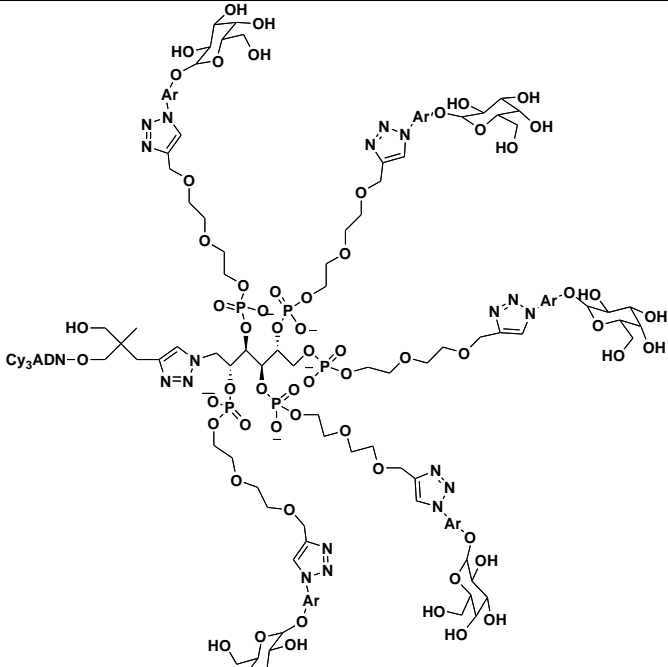
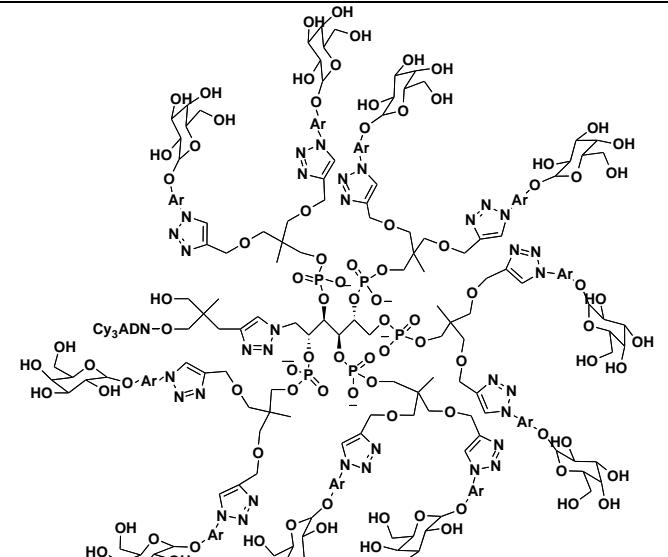
Les structures développées des glycoclusters sont listés dans les tableaux ci dessous.

7.1.1. Les Galactomimétiques ou galactoclusters

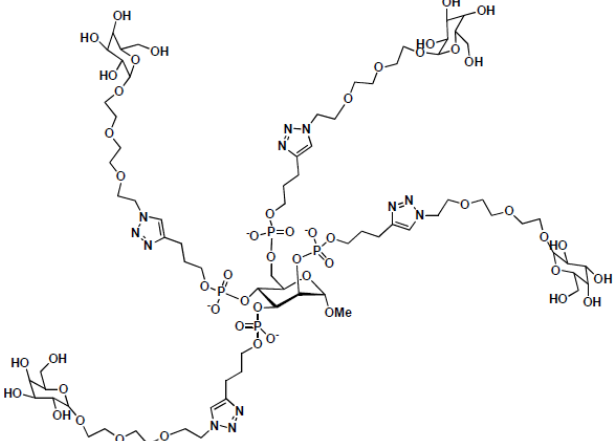
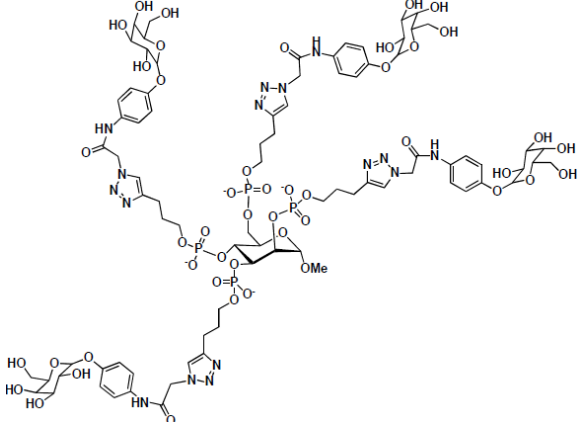
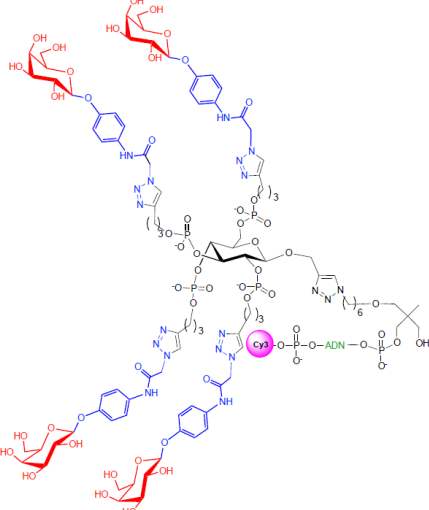
	Nom	Valence	Structure développée
	Monovalents		
1	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₁	1	
2	(Thme-MTz AcNAr-Gal) ₁	1	
3	(Thme-HexTz M-Gal) ₁	1	
	Linéaire en peigne		
4	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₃	3	
5	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	
6	(DMCH-MTz EG ₃ -Gal) ₅	5	
7	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₂	2	

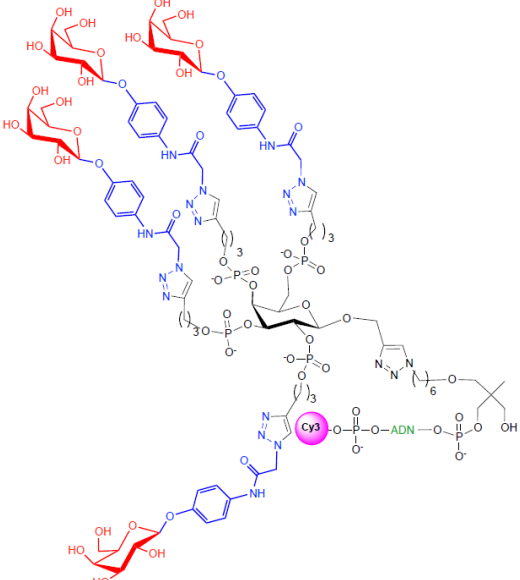
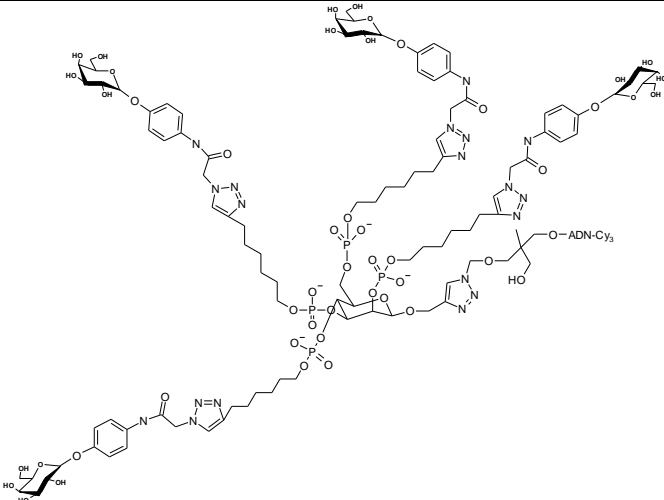
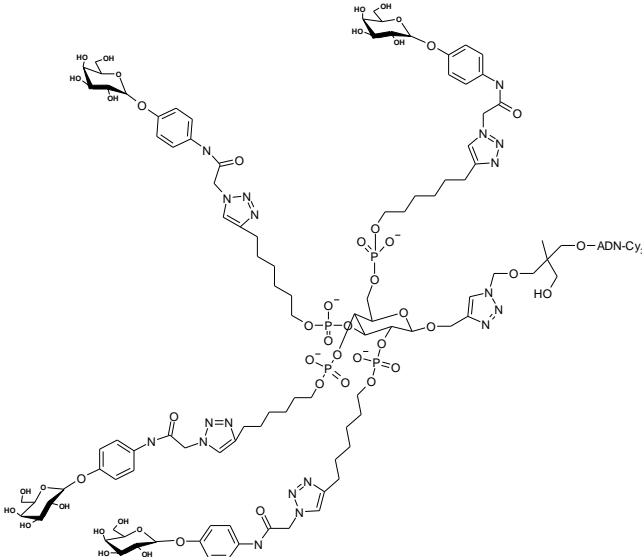
8	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₃	3	
9	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₄	4	
10	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₅	5	
11	(DMCH-MTz AcNAr-Gal) ₁₁₀₁	3	
11	(dT-MTz AcNAr-Gal) ₄	4	
12	(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁻	4	
13	(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	

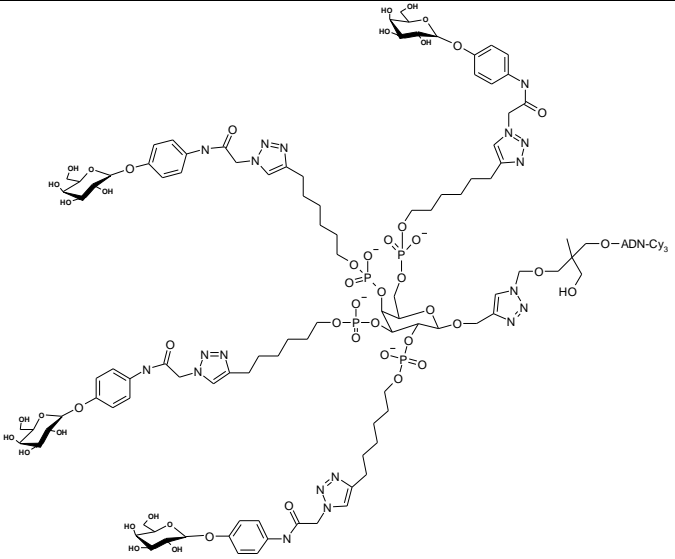
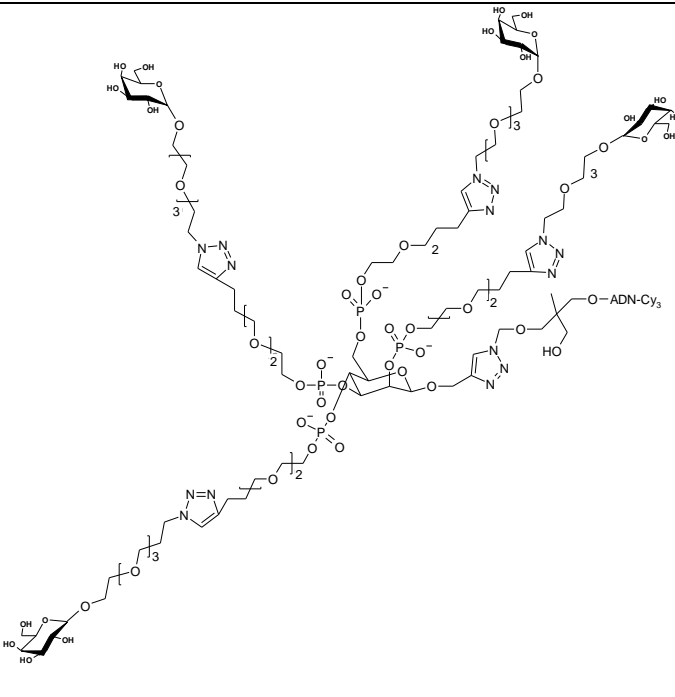
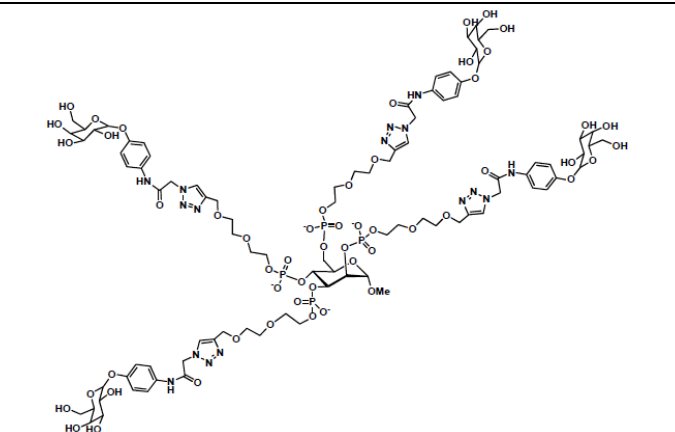
14	(Thme-MTz EG ₃ -Gal) ₄ ³⁺	4	 <p>Cy3 – GCG ATA GAG CGT TCC TCC T –</p>
15	(Thme-hexNH ₂ -MTz AcNAr-Gal) ₃ ³⁺	3	 <p>HO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂</p> <p>ADN</p>
Linéaire Antenné			
16	(Pe-MTz EG ₃ -Gal) ₂ ¹⁻	4	 <p>Cy3 – CAA GTT GTC CAA TAC TTA T –</p>
17	(Pe-MTz EG ₃ -Gal) ₂	4	 <p>Cy3 – AGC AAC CGC CAA CAA CTG T –</p>
18	(Pe-MTz EG ₃ -Gal) ₂ ¹⁺	4	 <p>Cy3 – ACA CCA AAG ATG ATA TTT T –</p>

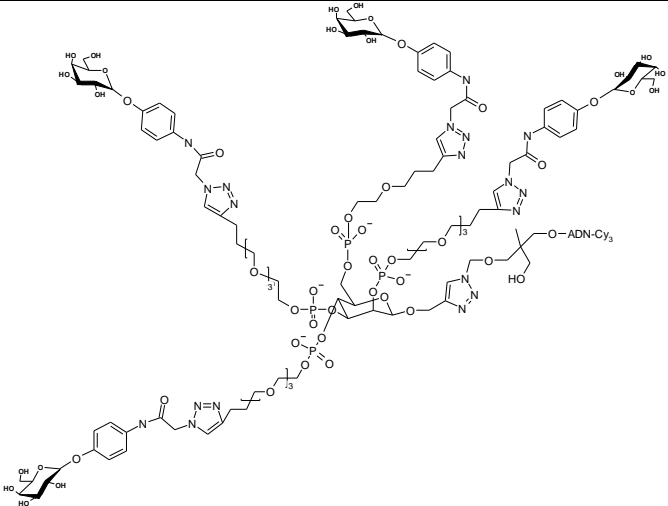
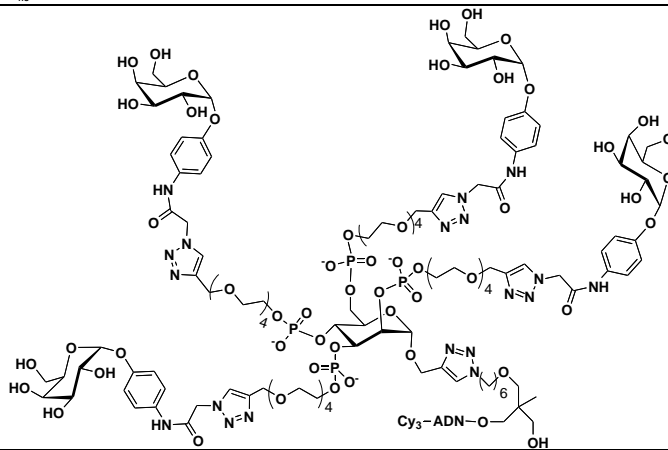
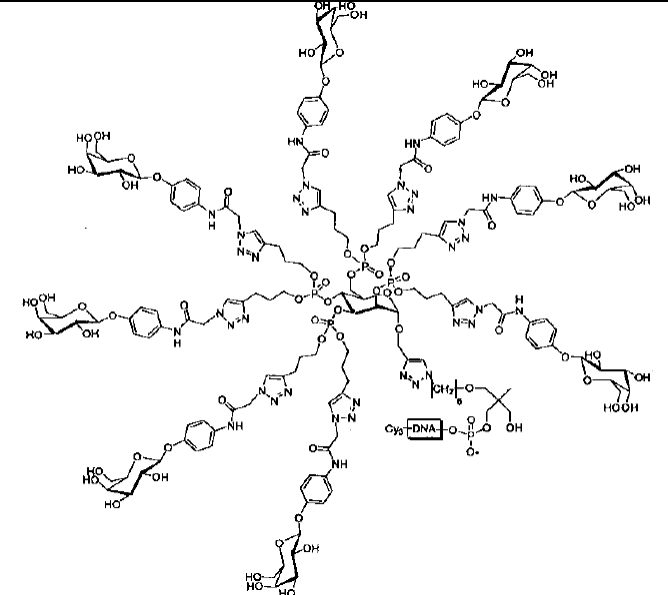
19	Mannitol-(pro Tz AcNAr -Gal) ₅	5	 <p>Chemical structure of Mannitol-(proTz AcNAr-Gal)₅. The structure shows a central Cy3-DNA zip1.1 core (labeled 'Cy3-DNA zip1.1') with five mannitol units attached via proTz and AcNAr linkers.</p>
20	Mannitol-(EG ₂ MTz AcNAr -Gal) ₅	5	 <p>Chemical structure of Mannitol-(EG₂MTz AcNAr-Gal)₅. The structure shows a central Cy₃ADN-O core with five mannitol units attached via EG₂MTz and AcNAr linkers.</p>
21	Mannitol[Thme(MTz AcNAr -Gal) ₂] ₅	10	 <p>Chemical structure of Mannitol[Thme(MTz AcNAr-Gal)₂]₅. The structure shows a central Cy₃ADN-O core with ten mannitol units attached via MTz and AcNAr linkers.</p>

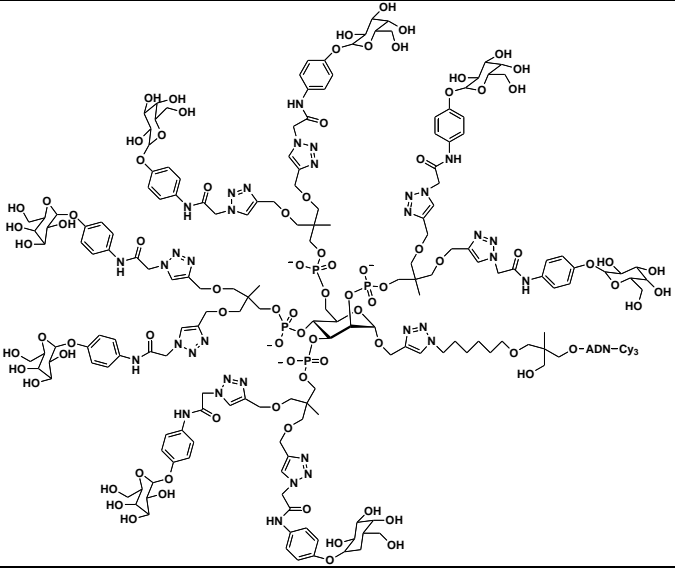
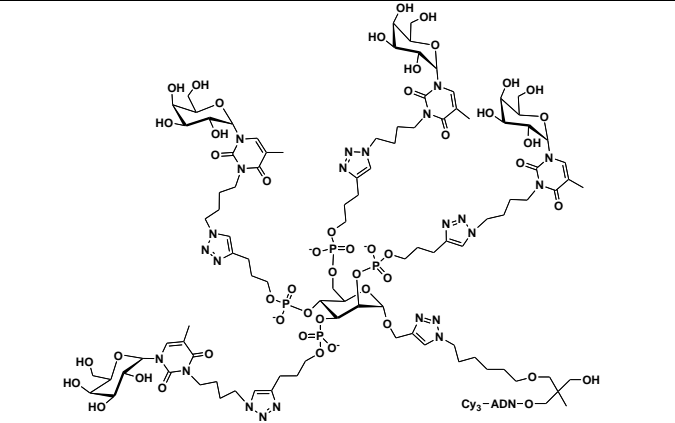
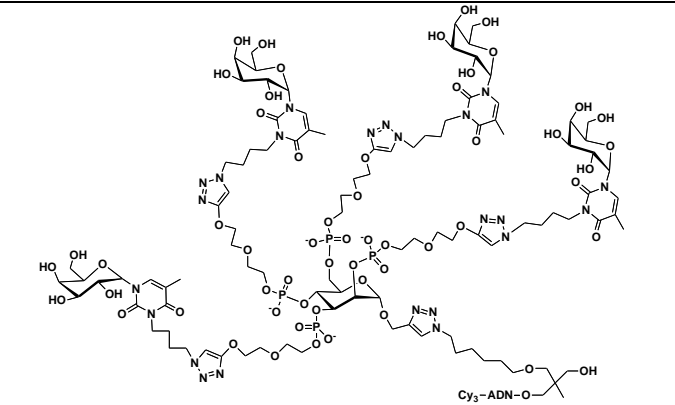
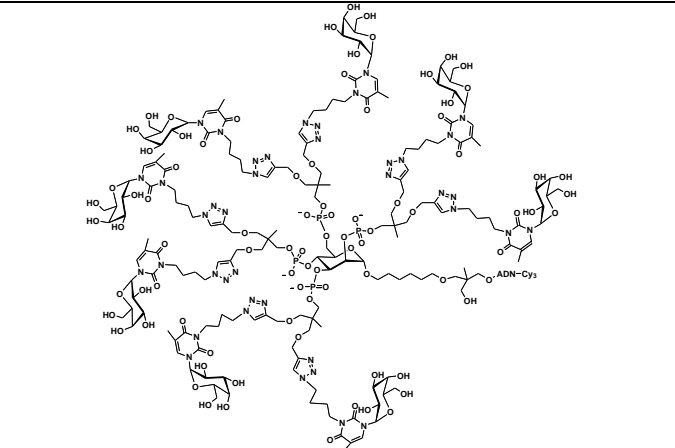
Hexose			
22	Man(pro Tz DMCH -Gal) ₄	4	
23	Man(pro Tz EG₂ -Gal) ₄	4	
24	Man(pro Tz pro -Gal) ₄	4	

25	Man(proTz EG ₃ -Gal) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(proTz EG₃-Gal)₄. It features a central mannose core with four galactose units attached via proTz linkers. The proTz linkers are connected to the galactose units through a series of ether and phosphonate groups, forming a complex, branched structure.</p>
26	Man(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(proTz AcNAr-Gal)₄. It features a central mannose core with four galactose units attached via proTz linkers. The proTz linkers are connected to the galactose units through a series of ether and phosphonate groups, forming a complex, branched structure. The structure is similar to the one in row 25, but with different substituents on the proTz linkers.</p>
27	Glc(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>Chemical structure of Glc(proTz AcNAr-Gal)₄. It features a central glucose core with four galactose units attached via proTz linkers. The proTz linkers are connected to the galactose units through a series of ether and phosphonate groups, forming a complex, branched structure. The structure is similar to the one in row 26, but with a glucose core instead of a mannose core. The structure is highlighted with red and blue colors.</p>

28	Gal(proTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central nucleotide core consisting of a ribose sugar, a phosphate group, and a cytosine base (labeled 'Cyt' in a pink circle). This core is linked to a long, branched dendritic structure. The dendrite is composed of multiple repeating units, each featuring a proTz (1,2,4,5-tetrazole) ring connected via an amide bond to an AcNAr (4-aminobenzoyl) group. The AcNAr groups are further substituted with galactose (Gal) units. The entire structure is highly branched, with four galactose units at the periphery, consistent with the subscript '4' in the formula.</p>
29	Man(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central nucleotide core with a ribose sugar, a phosphate group, and a cytosine base (labeled 'ADN-Cyt₃'). This core is linked to a long, branched dendritic structure. The dendrite is composed of multiple repeating units, each featuring a hexTz (1,2,4,5,6-hexaazabenzene) ring connected via an amide bond to an AcNAr (4-aminobenzoyl) group. The AcNAr groups are further substituted with galactose (Gal) units. The entire structure is highly branched, with four galactose units at the periphery, consistent with the subscript '4' in the formula.</p>
30	Glc(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central nucleotide core with a ribose sugar, a phosphate group, and a cytosine base (labeled 'ADN-Cyt₃'). This core is linked to a long, branched dendritic structure. The dendrite is composed of multiple repeating units, each featuring a hexTz (1,2,4,5,6-hexaazabenzene) ring connected via an amide bond to an AcNAr (4-aminobenzoyl) group. The AcNAr groups are further substituted with galactose (Gal) units. The entire structure is highly branched, with four galactose units at the periphery, consistent with the subscript '4' in the formula.</p>

31	Gal(hexTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central ADN-Cy3 core with four galactose units attached via phosphonate linkers. Each galactose unit is further substituted with a hexyl chain and a Tz (tetrazine) group, which is linked to an AcNAr (acetamido-4-nitrophenyl) group.</p>
32	Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Gal) ₄	4	 <p>The structure features a central ADN-Cy3 core with four mannose units. Each mannose unit is connected to a phosphonate linker, which is further substituted with an EG₂MTz (ethylene glycol chain with a tetrazine group) and an EG₃-Gal (ethylene glycol chain with a galactose unit) moiety.</p>
33	Man(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central ADN-Cy3 core with four mannose units. Each mannose unit is linked to a phosphonate group, which is further substituted with an EG₂MTz (ethylene glycol chain with a tetrazine group) and an AcNAr-Gal (acetamido-4-nitrophenyl-galactose) moiety.</p>

34	Man(EG ₃ MTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(EG₃MTz AcNAr-Gal)₄. The structure shows a central mannose core with four galactose units attached. Each galactose unit is linked to a 4-aminophenyl group, which is further connected to a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is substituted with a methyl group and a propyl chain. The propyl chain is linked to a phosphonate group, which is further connected to a poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a methyl group. The structure is labeled with 'ADN-Cy₃'.</p>
35	Man(EG ₄ MTz AcNAr-Gal) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(EG₄MTz AcNAr-Gal)₄. The structure shows a central mannose core with four galactose units attached. Each galactose unit is linked to a 4-aminophenyl group, which is further connected to a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is substituted with a methyl group and a propyl chain. The propyl chain is linked to a phosphonate group, which is further connected to a poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a methyl group. The structure is labeled with 'Cy₃-ADN-OH'.</p>
36	Man[(proTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	8	 <p>Chemical structure of Man[(proTz AcNAr-Gal)₂]₄. The structure shows a central mannose core with four galactose units attached. Each galactose unit is linked to a 4-aminophenyl group, which is further connected to a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring is substituted with a methyl group and a propyl chain. The propyl chain is linked to a phosphonate group, which is further connected to a poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a methyl group. The structure is labeled with 'Cy₃-DNA'.</p>

37	Man[Thme(MTz AcNAr-Gal) ₂] ₄	8	 <p>The structure shows a central mannose core with four phosphate groups. Each phosphate is linked to a thymine (Thme) base, which is further connected to a methyltetrazole (MTz) group. The MTz groups are linked to an acetylphenyl (AcNAr) group, which is finally linked to a galactose (Gal) moiety. The structure is highly branched and complex.</p>
38	Man(proTz BuT-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central mannose core with four phosphate groups. Each phosphate is linked to a prothymine (proTz) base, which is further connected to a butylthymine (BuT) group, which is finally linked to a galactose (Gal) moiety. The structure is branched and complex.</p>
39	Man(EG ₂ MTz BuT-Gal) ₄	4	 <p>The structure shows a central mannose core with four phosphate groups. Each phosphate is linked to a methyltetrazole (MTz) group, which is further connected to a butylthymine (BuT) group, which is finally linked to a galactose (Gal) moiety. The structure is branched and complex.</p>
40	Man[Thme(MTz BuT-Gal) ₂] ₄	8	 <p>The structure shows a central mannose core with four phosphate groups. Each phosphate is linked to a thymine (Thme) base, which is further connected to a methyltetrazole (MTz) group, which is finally linked to a butylthymine (BuT) group, which is finally linked to a galactose (Gal) moiety. The structure is highly branched and complex.</p>

Pentose			
41	Ara(proTz AcNAr-Gal) ₃	3	
42	Ara(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₃	3	
43	Xylo(ProTz AcNAr-Gal) ₃	3	
44	Xylo(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₃	3	

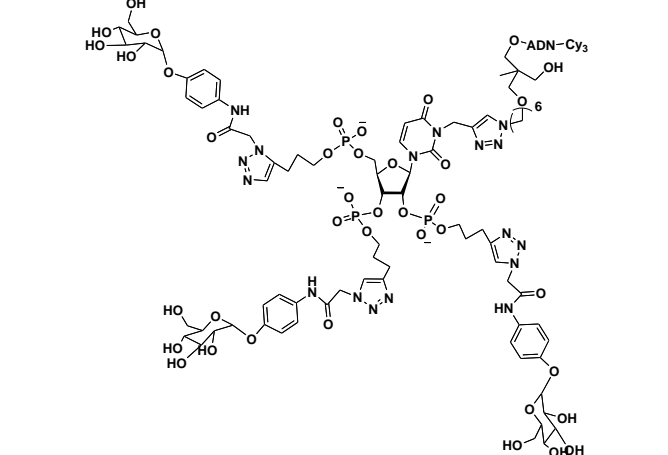
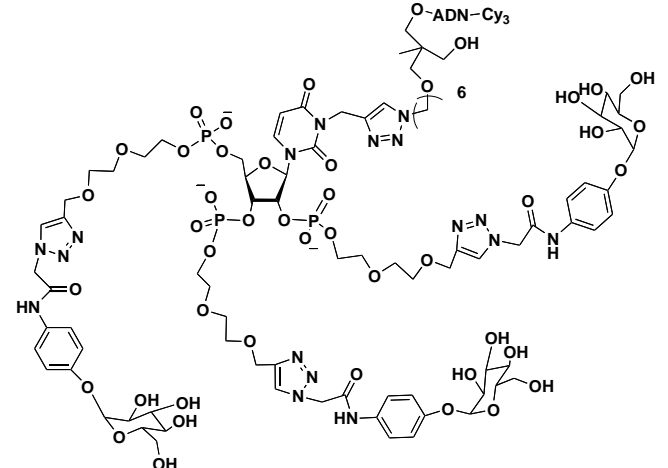
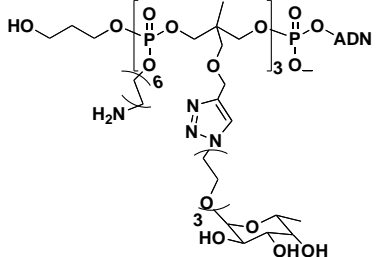
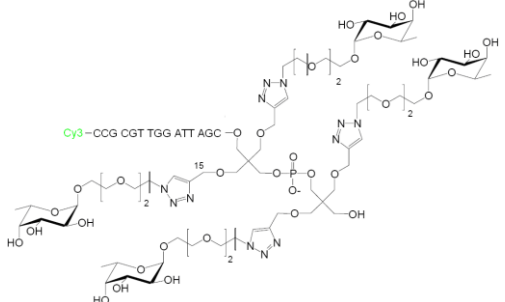
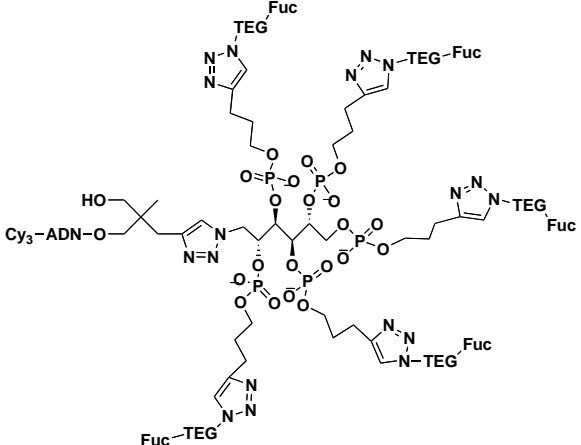
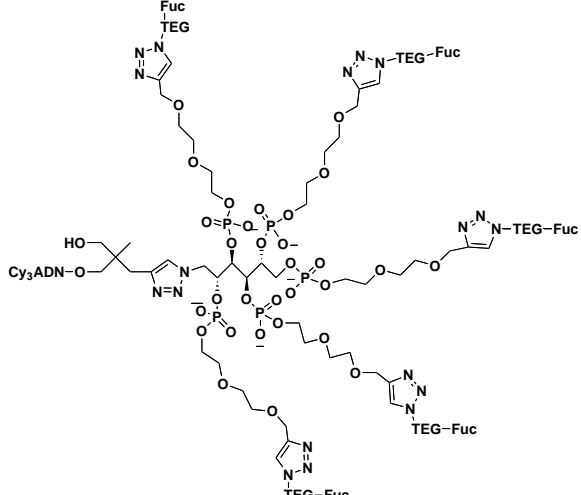
45	Ribo(ProTz AcNAr-Gal) ₃	3	
46	Ribo(EG ₂ MTz AcNAr-Gal) ₃	3	

Tableau 1 Structure développée de tous les galactoclusters étudiés.

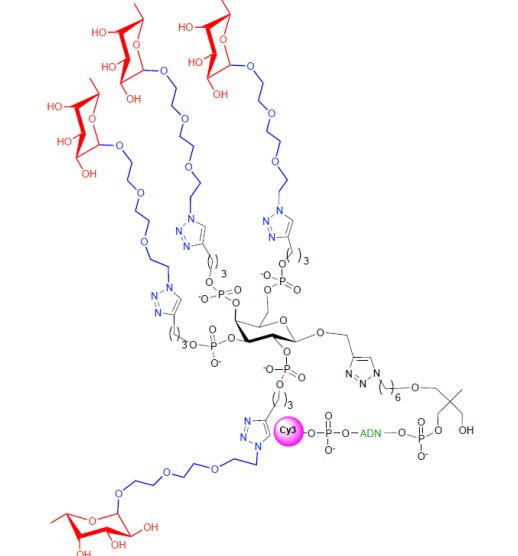
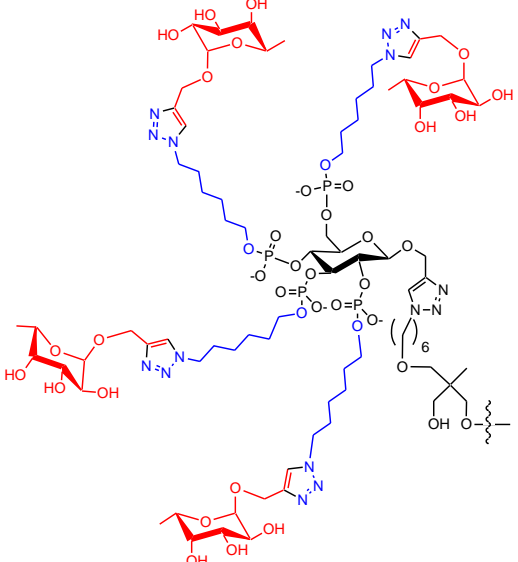
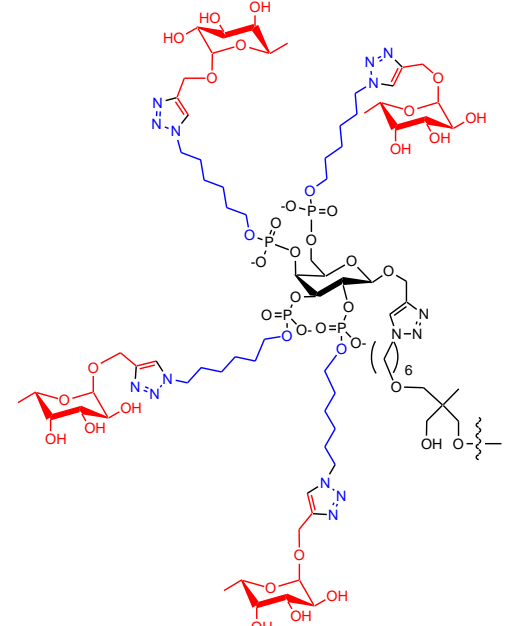
Tz= Triazole, M= Méthyle, Pro= Propyle, Hex= Hexyle, BuT=Butyle-Thymine, AcNAr = Acéthyle-N-Phényle, DMCH=Diméthanolcyclohexane, Thme= 1,1,1-(trishydroxyméthyle)ethane, Pe= Pentaerythritol, EG_{2/3/4}=Di/Tri/Tétra-éthylène glycol
 Man= Mannose, Glc= Glucose, Gal= Galactose, Ribo= Ribose, Xylo= Xylose, Ara= Arabinose

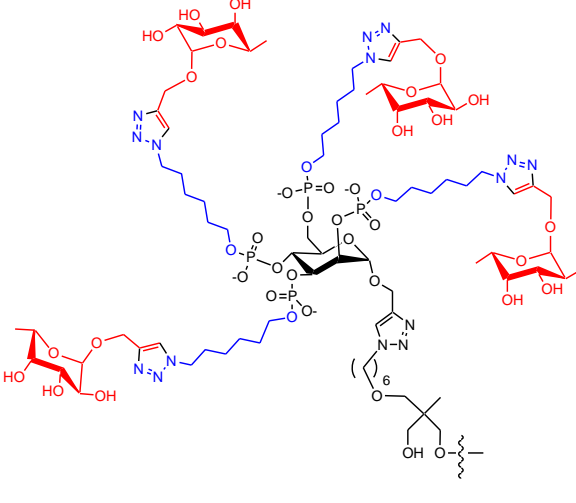
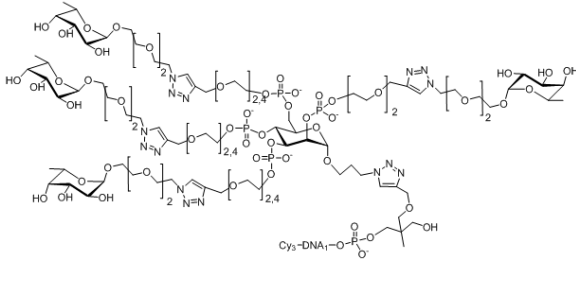
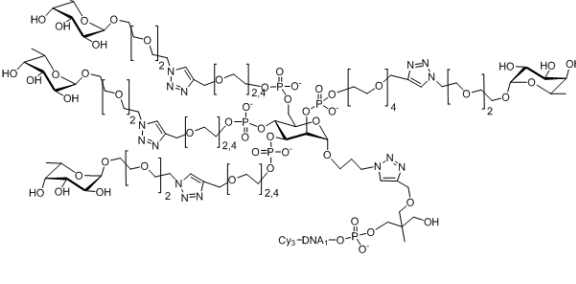
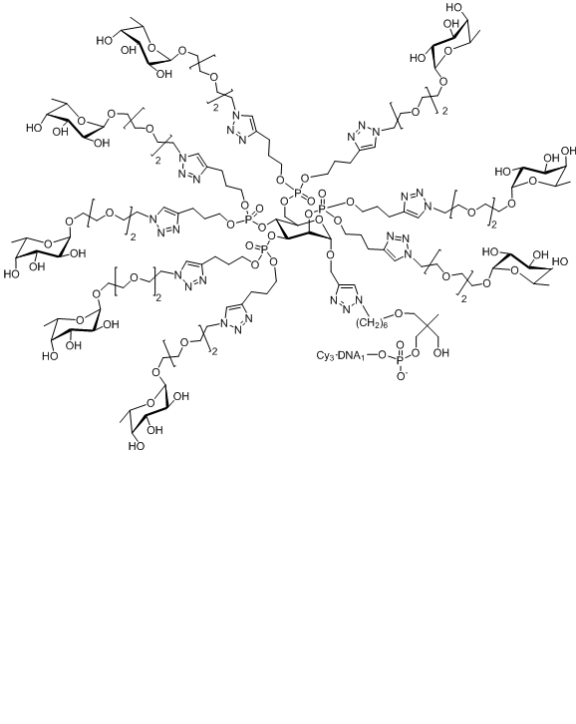
7.1.2. Les Fucomimétiques ou fucoclusters

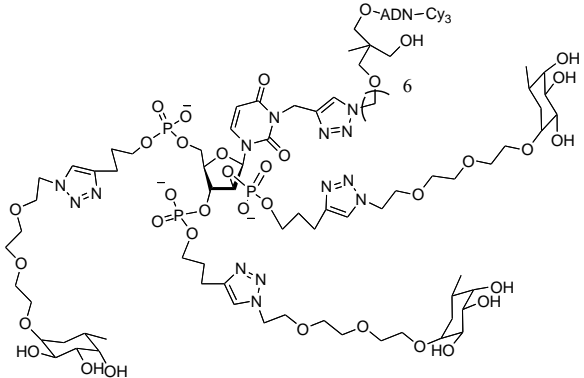
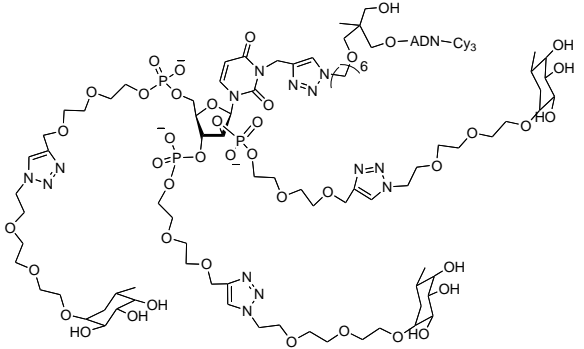
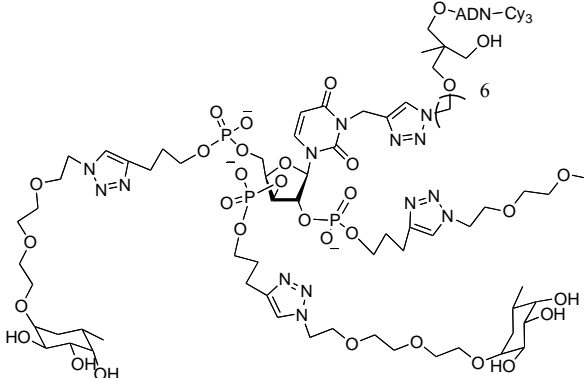
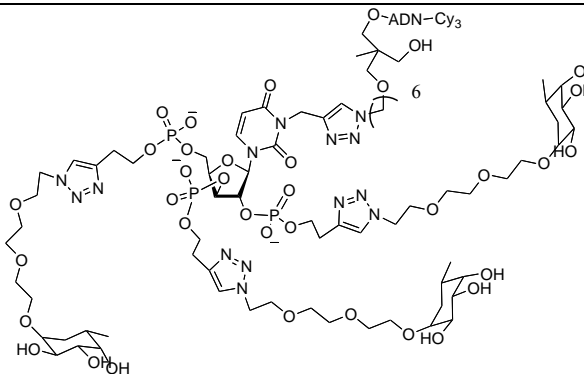
1	Nom	Valence	Structure développée
2	(Thme-MTz EG ₃ -Fuc) ₁	1	
3	(Thme-HexTz M-Fuc) ₁	1	
Linéaire en peigne			
4	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₂	2	
5	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	
6	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	
7	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₅	5	
8	(DMCH-MTz EG ₃ -Fuc) ₁₀₁	3	

9	(Thme-hexNH ₂ -MTz EG ₃ -Fuc) ₃ ⁺	3	
Linéaire Antenné			
10	(Pe-MTz EG ₃ -Fuc ₂) ₂	4	
11	Mannitol-(proTz Fuc) ₅ EG ₃ -	5	
12	Mannitol-(EG ₂ MTz Fuc) ₅ EG ₃ -	5	

13	Mannitol[Thme(MTz EG ₃ -Fuc) ₂] ₅	10	
Hexose			
14	Man(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	
15	Glc(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	

16	Gal(proTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	 <p>The structure shows a central galactose (Gal) core with four proTz (protonated tetrazine) groups. Each proTz group is linked via a long polyethylene glycol (PEG) chain to an EG₃ (triethylene glycol) moiety. The EG₃ moieties are further linked to fucose (Fuc) residues. The structure also includes a phosphate group and a cytosine (Cyt) residue, which is highlighted in a pink circle. The overall structure is highly branched and complex.</p>
17	Glc(hexTz M-Fuc) ₄	4	 <p>The structure shows a central glucose (Glc) core with four hexTz (hexyl tetrazine) groups. Each hexTz group is linked via a long polyethylene glycol (PEG) chain to a hexyl (hex) moiety. The hexyl moieties are further linked to fucose (Fuc) residues. The structure also includes a phosphate group and a cytosine (Cyt) residue. The overall structure is highly branched and complex.</p>
18	Gal(hexTz M-Fuc) ₄	4	 <p>The structure shows a central galactose (Gal) core with four hexTz (hexyl tetrazine) groups. Each hexTz group is linked via a long polyethylene glycol (PEG) chain to a hexyl (hex) moiety. The hexyl moieties are further linked to fucose (Fuc) residues. The structure also includes a phosphate group and a cytosine (Cyt) residue. The overall structure is highly branched and complex.</p>

19	Man(hexTz M-Fuc) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(hexTz M-Fuc)₄. The central mannose core is linked to four hexyl-terminated triazole rings (hexTz) via phosphonate groups. Each hexTz ring is further linked to a methyl-fucose (M-Fuc) residue. The structure is highly branched and complex.</p>
20	Man(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(EG₂MTz EG₃-Fuc)₄. The central mannose core is linked to four EG₂MTz-EG₃-Fuc branches via phosphonate groups. The structure is highly branched and complex.</p>
21	Man(EG ₄ MTz EG ₃ -Fuc) ₄	4	 <p>Chemical structure of Man(EG₄MTz EG₃-Fuc)₄. The central mannose core is linked to four EG₄MTz-EG₃-Fuc branches via phosphonate groups. The structure is highly branched and complex.</p>
22	Man([proTz EG ₃ -Fuc] ₂) ₄	8	 <p>Chemical structure of Man([proTz EG₃-Fuc]₂)₄. The central mannose core is linked to four [proTz EG₃-Fuc]₂ branches via phosphonate groups. The structure is highly branched and complex.</p>

Pentose			
23	Ara(proTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	 <p>Chemical structure of Ara(proTz EG₃-Fuc)₃. It features a central adenosine (A) nucleotide with a proTz group at the 6' position of the ribose sugar. This adenosine is linked via a triphosphate bridge to three other nucleotides: two thymidines (T) and one cytosine (C). The thymidines are substituted with EG₃ groups at their 3' positions, and the cytosine is substituted with a Fuc (fucose) group at its 2' position. The entire structure is shown in a cyclic conformation with a phosphate group at the 5' position.</p>
24	Ara(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	 <p>Chemical structure of Ara(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃. It features a central adenosine (A) nucleotide with an EG₂MTz group at the 6' position of the ribose sugar. This adenosine is linked via a triphosphate bridge to three other nucleotides: two thymidines (T) and one cytosine (C). The thymidines are substituted with EG₃ groups at their 3' positions, and the cytosine is substituted with a Fuc (fucose) group at its 2' position. The entire structure is shown in a cyclic conformation with a phosphate group at the 5' position.</p>
25	Xylo(ProTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	 <p>Chemical structure of Xylo(ProTz EG₃-Fuc)₃. It features a central adenosine (A) nucleotide with a proTz group at the 6' position of the ribose sugar. This adenosine is linked via a triphosphate bridge to three other nucleotides: two thymidines (T) and one cytosine (C). The thymidines are substituted with EG₃ groups at their 3' positions, and the cytosine is substituted with a Fuc (fucose) group at its 2' position. The entire structure is shown in a cyclic conformation with a phosphate group at the 5' position.</p>
26	Xylo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	 <p>Chemical structure of Xylo(EG₂MTz EG₃-Fuc)₃. It features a central adenosine (A) nucleotide with an EG₂MTz group at the 6' position of the ribose sugar. This adenosine is linked via a triphosphate bridge to three other nucleotides: two thymidines (T) and one cytosine (C). The thymidines are substituted with EG₃ groups at their 3' positions, and the cytosine is substituted with a Fuc (fucose) group at its 2' position. The entire structure is shown in a cyclic conformation with a phosphate group at the 5' position.</p>

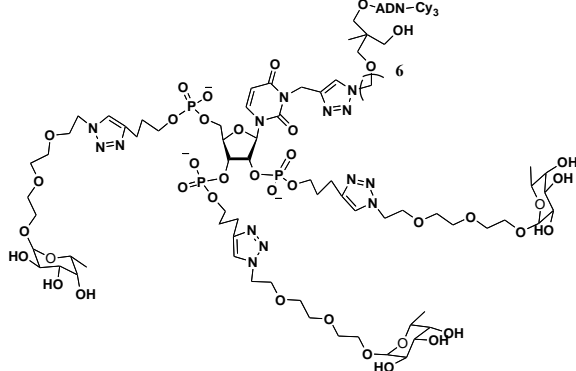
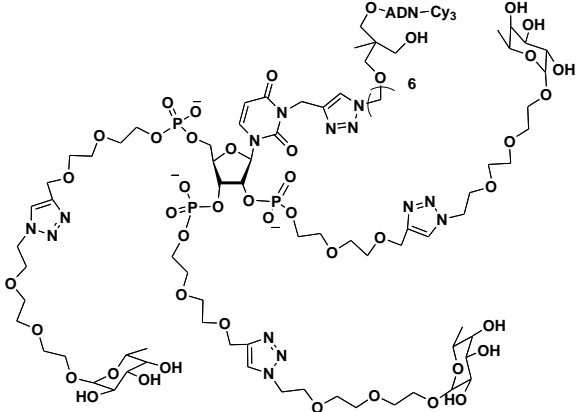
27	Ribo(ProTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	 <p>The structure shows a central ribose sugar (labeled '6') with three phosphate groups. Each phosphate is linked to a ProTz (1,2,4,5-tetraazapentane) molecule, which is further connected to an EG₃ (triethylene glycol) chain. The EG₃ chains are terminated with fucose (Fuc) units. One of the fucose units is labeled 'O-ADN-Cy₃'.</p>
28	Ribo(EG ₂ MTz EG ₃ -Fuc) ₃	3	 <p>The structure is similar to the one above, but the central ribose sugar is replaced by a 2-methyltetraazapentane (MTz) sugar. The rest of the structure, including the phosphate groups, ProTz molecules, EG₃ chains, and fucose units, remains the same.</p>

Tableau 2 Structure développée de tous les fucoclusters étudiés.

7.1.3. L'hétéroglycocluster

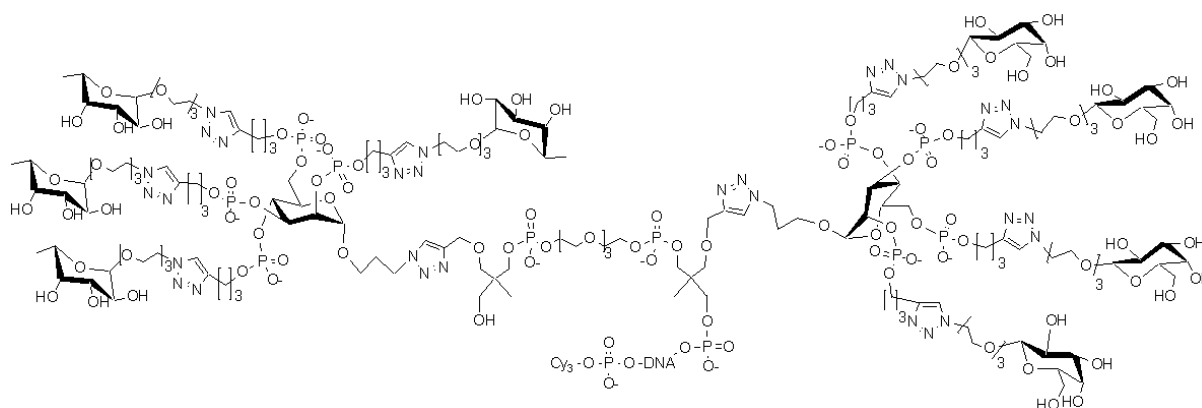


Figure 2 Structure développée du **Fuc₄Gal₄** ou bien Grappe-[Man(proTz EG₃-Gal)₄]-[Man(proTz EG₃-Fuc)₄]

7.2. Séquences ADN

Référence	Séquence ADN 5'→3' (Zip)	Séquence ADN 5'→3' (C_Zip)
Zip 1.1	5'-GTG AGC CCA GAG GCA GGG-(CH ₂) ₇ -NH ₂	CTG CCT CTG GGC TCA
Zip 1.2	5'-GCT AAT CCA ACG CGG GCC AAT CCT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	CCG CGT TGG ATT AGC
Zip 1.3	5'-GTG GAG GCA CCA AGC TTT- (CH ₂) ₇ -NH ₂	GCT TGG TGC CTC CAC
Zip 1.4	5'- CCA AGC GAG GTG GCA TTT- (CH ₂) ₇ -NH ₂	TGC CAC CTC GCT TGG
Zip 1.5	5'-CCA GCA GTG GAG AGC TTT - (CH ₂) ₇ -NH ₂	GCT CTC CAC TGC TGG
Zip 1.6	5'-GCA GAG AGC GTG CCA TTT - (CH ₂) ₇ -NH ₂	TGG CAC GCT CTC TGC
Zip 1.7	5'- TTC TGT TCT CAG TTT TCC TTT T- (CH ₂) ₇ -NH ₂	AGG AAA ACT GAG AAC AGA A
Zip 1.8	5'-AGT GGA GGT CAA CGA GCA ATT T - (CH ₂) ₇ -NH ₂	TTG CTC GTT GAC CTC CAC T
Zip 1.9	5'-AGG AGG AAC GCT CTA TCG CTT T -(CH ₂) ₇ -NH ₂	GCG ATA GAG CGT TCC TCC T
Zip 1.10	5'-TGT GGA CTT GGT TTC TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	GAA ACC AAG TCC ACA
Zip 1.11	5'-ATA AGT ATT GGA CAA CTT GTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	CAA GTT GTC CAA TAC TTA T
Zip 1.12	5'-GTG AAC GTT TCC TCG TTT-(CH ₂) ₇ -NH ₂	CGA GGA AAC GTT CAC
Zip 1.13	5'-ACA GTT GTT GGC GGT TGC TTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	AGC AAC CGC CAA CAA CTG T
Zip 1.14	5'-AAA ATA TCA TCT TTG GTG TTT T-(CH ₂) ₇ -NH ₂	ACA CCA AAG ATG ATA TTT T

Tableau 3 Séquences ADN immobilisées (Zip) avec les séquences complémentaires liées aux glycoclusters (C_Zip)

Bibliographie

- Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G., 2005. *Organic and Biomolecular Chemistry* 3(9), 1593-1608.
- Andreini, M., Anderluh, M., Audfray, A., Bernardi, A., Imberty, A., 2010. *Carbohydr. Res.* 345(10), 1400-1407.
- Angeloni, S., Ridet, J.L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., Sprenger, N., 2005. *Glycobiology* 15(1), 31-41.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R., 1998. *Infect. Immun.* 66(3), 1000-1007.
- Atkins, P.W., 1990. *Physical chemistry*, fourth ed.
- Audfray, A., Claudinon, J., Abounit, S., Ruvoen-Clouet, N., Larson, G., Smith, D.F., Wimmerova, M., Le Pendu, J., Roemer, W., Varrot, A., Imberty, A., 2012. *Journal of Biological Chemistry* 287(6), 4335-4347.
- Berlier, J.E., Rothe, A., Buller, G., Bradford, J., Gray, D.R., Filanoski, B.J., Telford, W.G., Yue, S., Liu, J.X., Cheung, C.Y., Chang, W., Hirsch, J.D., Beechem, J.M., Haugland, R.P., Haugland, R.P., 2003. *J. Histochem. Cytochem.* 51(12), 1699-1712.
- Blanchard, B., Nurisso, A., Hollville, E., Tetaud, C., Wiels, J., Pokorna, M., Wimmerova, M., Varrot, A., Imberty, A., 2008. *J. Mol. Biol.* 383(4), 837-853.
- Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M.E., Alvarez, R., Bryan, M.C., Fazio, F., Calarese, D., Stevens, J., Razi, N., Stevens, D.J., Skehel, J.J., van Die, I., Burton, D.R., Wilson, I.A., Cummings, R., Bovin, N., Wong, C.H., Paulson, J.C., 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(49), 17033-17038.
- Bochner, B.S., Alvarez, R.A., Mehta, P., Bovin, N.V., Blixt, O., White, J.R., Schnaar, R.L., 2005. *J. Biol. Chem.* 280(6), 4307-4312.
- Bombera, R., Leroy, L., Livache, T., Roupioz, Y., 2012. *Biosens. Bioelectron.* 33(1), 10-16.
- Briand, E., Salmain, M., Compere, C., Pradier, C.M., 2006. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 53(2), 215-224.
- Briandet, R., Faechner, L., Naitali, M., Dreanno, C., 2012. *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, QUAE ed.
- Bryan, M.C., Fazio, F., Lee, H.K., Huang, C.Y., Chang, A., Best, M.D., Calarese, D.A., Blixt, C., Paulson, J.C., Burton, D., Wilson, I.A., Wong, C.H., 2004. *J. Am. Chem. Soc.* 126(28), 8640-8641.
- Bundle, D.R., 1997. Antibody-oligosaccharide interactions determined by crystallography. In: Gabius, H.-J.G.a.S. (Ed.), *In Glycosciences: Status and perspective*, ed. Chapman and Hall, Weinheim, p. 311-331.
- Bundle, D.R., Baumann, H., Brisson, J.R., Gagne, S.M., Zdanov, A., Cygler, M., 1994. *Biochemistry* 33(17), 5183-5192.
- Caldara, M., Friedlander, R.S., Kavanaugh, N.L., Aizenberg, J., Foster, K.R., Ribbeck, K., 2012. *Curr. Biol.* 22(24), 2325-2330.

- Carbain, B., Martin, S.R., Collins, P.J., Hitchcock, P.B., Streicher, H., 2009. *Org & Biomol Chem* 7(12), 2570-2575.
- Carlet, J., 1994. *Infections nosocomiales*, 24, pp12-18, Médecine et maladies infectieuses ed.
- Carroll, G.T., Wang, D., 2012. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 808, 393-400.
- Cecioni, S., Faure, S., Darbost, U., Bonnamour, I., Parrot-Lopez, H., Roy, O., Taillefumier, C., Wimmerova, M., Praly, J.-P., Imberty, A., Vidal, S., 2011. *Chemistry-A European Journal* 17(7), 2146-2159.
- Cecioni, S., Lator, R., Blanchard, B., Praly, J.P., Imberty, A., Matthews, S.E., Vidal, S., 2009. *Chemistry a European Journal* 15(47), 13232-13240.
- Cecioni, S., Praly, J.P., Matthews, S.E., Wimmerová, M., Imberty, A., Vidal, S., 2012. *Chemistry-A European Journal* 00(0), 00-00.
- Chabre, Y.M., Giguere, D., Blanchard, B., Rodrigue, J., Rocheleau, S., Neault, M., Rauthu, S., Papadopoulos, A., Arnold, A.A., Imberty, A., Roy, R., 2011. *Chemistry-A European Journal* 17(23), 6545-6562.
- Charrier, D., Chevolut, Y., Cloarec, J.P., Goudot, A., Géhin, T., Roux, C., Dugas, V., Vidal, S., Vasseur, J.J., Morvan, F., Souteyrand, E., 2011. *Procedia Engineering Eurosensors* 25, 932-935.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B.P., Faure, K., 2009. *Infect. Immun.* 77(5), 2065-2075.
- Chen, C.P., Song, S.C., Gilboa-Garber, N., Chang, K.S.S., Wu, A.M., 1998. *Glycobiology* 8(1), 7-16.
- Cheng, Y., Prusoff, W.H., 1973. *Biochem. Pharmacol.* 22(23), 3099-3108.
- Chevolut, Y., Bouillon, C., Vidal, S., Morvan, F., Meyer, A., Cloarec, J.P., Jochum, A., Praly, J.P., Vasseur, J.J., Souteyrand, E., 2007a. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46(14), 2398-2402.
- Chevolut, Y., Laurenceau, E., Souteyrand, E., 2007b. *ITBM-RBM* 28(5-6), 194-209.
- Cholley, P., Thouverez, M., Floret, N., Bertrand, X., Talon, D., 2008. *Intensive Care Med.* 34(8), 1428-1433.
- Cioci, G., Mitchell, E.P., Gautier, C., Wimmerova, M., Sudakevitz, D., Perez, S., Gilboa-Garber, N., Imberty, A., 2003. *FEBS Lett.* 555(2), 297-301.
- Consoli, G.M.L., Granata, G., Cafiso, V., Stefani, S., Geraci, C., 2011. *Tetrahedron Lett.* 52(44), 5831-5834.
- Costerton, J.W., 1999. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11(3-4), 217-221.
- database, p., 2013. *pdb database*.
- de Becdelievre, A., Costa, C., Jouannic, J.M., LeFloch, A., Giurgea, I., Martin, J., Medina, R., Boissier, B., Gameiro, C., Muller, F., Goossens, M., Alberti, C., Girodon, E., 2011. *Hum. Genet.* 129(4), 387-396.
- De Bruijn, H.E., Kooyman, R.P.H., Greve, J., 1992. *Appl. Opt.* 31(4), 440-442.
- De Paz, J.L., Seeberger, P.H., 2006. *Qsar & Combinatorial Science* 25(11), 1027-1032.
- Deguisse, I., Lagnoux, D., Roy, R., 2007. *New J. Chem.* 31(7), 1321-1331.
- Dejous, C., 2005. Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGENIEUR, p. 126. Université Bordeaux 1, Bordeaux.

- Demirel, G., Caglayan, M.O., Garipcan, B., Piskin, E., 2008. *Surf. Sci.* 602(4), 952-959.
- Dhayal, M., Ratner, D.A., 2009. *Langmuir* 25(4), 2181-2187.
- Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P., Winzer, K., 2006. *Environmental Microbiology* 8(6), 1095-1104.
- Donohue, M.D., Aranovich, G.L., 1998. *Adv. Colloid Interface Sci.* 76, 137-152.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, X., Yang, Y., Zhu, J., Bao, W., Wu, S., Ruan, X., Zhang, W., Zhu, G., 2013. *Microb. Pathog.* 55, 32-38.
- Dubiel, E.A., Martin, Y., Vermette, P., 2011. *Chem. Rev.* 111(4), 2900-2936.
- Dugas, V., Chevalier, Y., 2003. *J. Colloid Interface Sci.* 264(2), 354-361.
- Dugas, V., Depret, G., Chevalier, Y., Nesmeb, X., Souteyrand, E., 2004. *Sens. Actuators, B* 101, 112-121.
- Duverger, E., Frison, N., Roche, A.C., Monsigny, M., 2003. *Biochimie* 85(1-2), 167-179.
- Dyukova, V.I., Shilova, N.V., Galanina, O.E., Rubina, A.Y., Bovin, N.V., 2006. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(4), 603-609.
- Elbs, M., Brock, R., 2003. *Anal. Chem.* 75(18), 4793-4800.
- Ernst, B., Magnani, J.L., 2009. *Nat. Rev. Drug Discovery* 8(8), 661-677.
- Fazio, F., Bryan, M.C., Blixt, O., Paulson, J.C., Wong, C.H., 2002. *J. Am. Chem. Soc.* 124(48), 14397-14402.
- Feizi, T., Chai, W.G., 2004. *Nature* 5(7), 582-588.
- Feizi, T., Fazio, F., Chai, W.C., Wong, C.H., 2003. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13(5), 637-645.
- Firon, N., Ashkenazi, S., Mirelman, D., Ofek, I., Sharon, N., 1987. *Infect. Immun.* 55(2), 472-476.
- Franzen, U., Ostergaard, J., 2012. *J. Chromatogr. A* 1267, 32-44.
- Gabius, H.-J., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., Solis, D., 2011. *Trends Biochem. Sci.* 36(6), 298-313.
- Galanina, O.E., Mecklenburg, M., Nifantiev, N.E., Pazynina, G.V., Bovin, N.V., 2003. *Lab on a chip* 3, 260-265.
- Gerland, B., Goudot, A., Pourceau, G., Meyer, A., Dugas, V., Cecioni, S., Vidal, S., Souteyrand, E., Vasseur, J.-J., Chevolut, Y., Morvan, F., 2012a. *Bioconjug. Chem.* 23(8), 1534-1547.
- Gerland, B., Goudot, A., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Souteyrand, E., Vasseur, J.-J., Chevolut, Y., Morvan, F., 2012b. *The Journal of organic chemistry* 77(17), 7620-7626.
- Gestwicki, J.E., Cairo, C.W., Strong, L.E., Oetjen, K.A., Kiessling, L.L., 2002. *J. Am. Chem. Soc.* 124(50), 14922-14933.
- Gilboa-Garber, N., 1982. *Methods Enzymol.* 83, 378-385.
- Gilboa-Garber, N., Katcoff, D.J., Garber, N.C., 2000. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29(1), 53-57.
- Goehler, A., Andre, S., Kaltner, H., Sauer, M., Gabius, H.-J., Doose, S., 2010. *Biophysical Journal* 98(12), 3044-3053.
- Gordus, A., MacBeath, G., 2006. *J. Am. Chem. Soc.* 128(42), 13668-13669.
- Gorska, K., Huang, K.-T., Chaloin, O., Winssinger, N., 2009. *Angewandte Chemie-International Edition* 48(41), 7695-7700.

- Goudot, A., Pourceau, G., Meyer, A., Gehin, T., Vidal, S., Vasseur, J.J., Morvan, F., Souteyrand, E., Chevolut, Y., 2013. Biosens. Bioelectron., Accepted.
- Goudot, A., Zhang, J., Pourceau, G., Meyer, A., Cloarec, J.P., Rouanet, S., Vidal, S., Vasseur, J.J., Morvan, F., Chevolut, Y., Souteyrand, E., 2011. Procedia Engineering Eurosensors 25, 1553-1556.
- Guillaumie, F., Thomas, O.R.T., Jensen, K.J., 2002. Bioconjug. Chem. 13(2), 285-294.
- Gupta, D., Cho, M.J., Cummings, R.D., Brewer, C.F., 1996. Biochemistry 35(48), 15236-15243.
- Haake, H.M., Schutz, A., Gauglitz, G., 2000. Fresenius Journal Of Analytical Chemistry 366(6-7), 576-585.
- Hauber, H.-P., Schulz, M., Pforte, A., Mack, D., Zabel, P., Schumacher, U., 2008. Int J Med Sci 5(6), 371-376.
- He, L., Andre, S., Garamus, V.M., Siebert, H.-C., Chi, C., Niemeyer, B., Gabius, H.-J., 2009. Glycoconjugate Journal 26(1), 111-116.
- Heegaard, N.H.H., Nilsson, S., Guzman, N.A., 1998. Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences 715(1), 29-54.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., 2010. Int. J. Antimicrob. Agents 35(4), 322-332.
- Homola, J., 2008. Chem. Rev. 108(2), 462-493.
- Homola, J., Ctyroky, J., Skalsky, M., Hradilova, J., Kolarova, P., 1997. Sensors And Actuators B-Chemical 39(1-3), 286-290.
- Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G., 1999. Sens. Actuators, B 54(1-2), 3-15.
- http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemies-et-agents-infectieux/comprendre/grippe-aviaire/images_cycle_virus/virus_cycle500.gif/view, 2013. Virus infectious cycle.
- <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch112/influenza.htm>, 2013. HA/sialic acid interaction.
- http://www.cbs.dtu.dk/courses/mvnworkshop08/Ex_ProbeDesign/flagella.png, 2013. FliD.
- <http://www.pseudomonas.com>, 2013. Pseudomonas Database. Cystic Fibrosis foundation Therapeutics.
- <http://www.vaincrelamuco.org>, 2013. Registre Français de la Mucoviscidose.
- Huang, K.-T., Gorska, K., Alvarez, S., Barluenga, S., Winssinger, N., 2011. ChemBioChem 12(1), 56-60.
- Imberty, A., Chabre, Y.M., Roy, R., 2008. Chemistry-A European Journal 14(25), 7490-7499.
- Imberty, A., Mitchell, E.P., Wimmerova, M., 2005. Curr. Opin. Struct. Biol. 15(5), 525-534.
- Imberty, A., Varrot, A., 2008. Curr. Opin. Struct. Biol. 18, 567-576.
- Imberty, A., Wimmerova, M., Mitchell, E.P., Gilboa-Garber, N., 2004. Microbes and Infection 6(2), 221-228.
- Imen, H., 2009. Etude physico-chimique de capteurs à base de nanomatériaux pour des applications biomédicales. Electronique, Electrotechnique et Automatisme, p. 198. INSA, Lyon.
- Islam, T., Von Itzstein, M., 2008. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 61, 293-352.

- Johansson, E.M.V., Crusz, S.A., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, R.U., Cacciarini, M., Bartels, K.-M., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P., Loris, R., Nativi, C., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Darbre, T., Reymond, J.-L., 2008. *Chem. Biol.* 15(12), 1249-1257.
- Johansson, E.M.V., Kadam, R.U., Rispoli, G., Crusz, S.A., Bartels, K.-M., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P., Jaeger, K.-E., Darbre, T., Reymond, J.-L., 2011. *MedChemComm* 2(5), 418-420.
- Jones, R.B., Gordus, A., Krall, J.A., MacBeath, G., 2006. *Nature* 439(7073), 168-174.
- Kadam, R.U., Bergmann, M., Hurley, M., Garg, D., Cacciarini, M., Swiderska, M.A., Nativi, C., Sattler, M., Smyth, A.R., Williams, P., Camara, M., Stocker, A., Darbre, T., Reymond, J.-L., 2011. *Angewandte Chemie-International Edition* 50(45), 10631-10635.
- Kasai, K., Ishii, S., 1978. *J. Biochem. (Tokyo)*. 84(5), 1051-1060.
- Katinger, D., Mochalova, L., Chinarev, A., Bovin, N., Romanova, J., 2004. *Arch. Virol.* 149(11), 2131-2140.
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C., 1989. *Science (New York, N.Y.)* 245(4922), 1073-1080.
- Kick, A., Bonsch, M., Katzschner, B., Voigt, J., Herr, A., Brabetz, W., Jung, M., Sonntag, F., Klotzbach, U., Danz, N., Howitz, S., Mertig, M., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 26(4), 1543-1547.
- Kim, M.K., Brandley, B.K., Anderson, M.B., Bochner, B.S., 1998. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19(5), 836-841.
- Kitov, P.I., Bundle, D.R., 2003. *J. Am. Chem. Soc.* 125(52), 16271-16284.
- Ko, K.S., Jaipuri, F.A., Pohl, N.L., 2005. *J. Am. Chem. Soc.* 127(38), 13162-13163.
- Kohn, M., Wacker, R., Peters, C., Schroder, H., Soulere, L., Breinbauer, R., Niemeyer, C.M., Waldmann, H., 2003. *Angewandte Chemie-International Edition* 42(47), 5830-5834.
- Kolomiets, E., Swiderska, M.A., Kadam, R.U., Johansson, E.M.V., Jaeger, K.-E., Darbre, T., Reymond, J.-L., 2009. *Chemmedchem* 4(4), 562-569.
- Kretschmann, E., Raether, H., 1968. *ZEITSCHRIFT FUER NATURFORSCHUNG* 23A, 2135-2136.
- Lallemant, D., Rouillat, M.H., Dugas, V., Chevotot, Y., Souteyrand, E., Phaner-Goutorbe, M., 2007. AFM characterization of ss-DNA probes immobilization: a sequence effect on surface organization. *Proceedings Of The International Conference On Nanoscience And Technology*, ed., pp. 658-662.
- Laurent, N., Haddoub, R., Flitsch, S.L., 2008a. *Trends Biotechnol.* 26(6), 328-337.
- Laurent, N., Voglmeir, J., Flitsch, S.L., 2008b. *Chem. Commun.*(37), 4400-4412.
- Laurent, N., Voglmeir, J., Wright, A., Blackburn, J., Pham, N.T., Wong, S.C.C., Gaskell, S.J., Flitsch, S.L., 2008c. *ChemBioChem* 9(6), 883-887.
- Lavastre, V., Pelletier, M., Saller, R., Hostanska, K., Girard, D., 2002. *Journal of Immunology* 168(3), 1419-1427.
- Lee, M.R., Shin, I., 2005. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44(19), 2881-2884.
- Lee, Y.C., Lee, R.T., 1995. *Acc. Chem. Res.* 28(8), 321-327.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., Poirier, F., 2004. *Glycoconjugate Journal* 19(7-9), 433-440.

- Li, L.Y., Chen, S.F., Zheng, J., Ratner, B.D., Jiang, S.Y., 2005. *Journal Of Physical Chemistry B* 109(7), 2934-2941.
- Liang, P.H., Wang, S.K., Wong, C.H., 2007. *J. Am. Chem. Soc.* 129(36), 11177-11184.
- Lin, B., Li, P., Cunningham, B.T., 2006. *Sensors And Actuators B-Chemical* 114(2), 559-564.
- Linman, M.J., Taylor, J.D., Yu, H., Chen, X., Cheng, Q., 2008. *Anal. Chem.* 80(11), 4007-4013.
- Lis, H., Sharon, N., 1998. *Chem. Rev.* 98(2), 637-674.
- Livermore, D.M., 2002. *Clin. Infect. Dis.* 34(5), 634-640.
- Lopes, S.P., Ceri, H., Azevedo, N.F., Pereira, M.O., 2012. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40(3), 260-263.
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M., 2005. *Chem. Rev.* 105(4), 1103-1169.
- Lundquist, J.J., Toone, E.J., 2002. *Chem. Rev.* 102(2), 555-578.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2002. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 194-222.
- Mah, T.F.C., O'Toole, G.A., 2001. *Trends Microbiol.* 9(1), 34-39.
- Mamidyala, S.K., Ko, K.-S., Jaipuri, F.A., Park, G., Pohl, N.L., 2006. *J. Fluorine Chem.* 127(4-5), 571-579.
- Mammen, M., Choi, S.K., Whitesides, G.M., 1998. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37(20), 2755-2794.
- Mannelli, I., Courtois, V., Lecaruyer, P., Roger, G., Millot, M.C., Goossens, M., Canva, M., 2006. *Sensors And Actuators B-Chemical* 119(2), 583-591.
- Marotte, K., Eville, C.P., Sabin, C., Pymbock, M.M., Imberty, A., Roy, R., 2007. *OBC* 5(18), 2953-2961.
- Marras, S.A.E., Kramer, F.R., Tyagi, S., 2002. *Nucleic Acids Res.* 30(21).
- Mazurczyk, R., El Khoury, G., Dugas, V., Hannes, B., Laurenceau, E., Cabrera, M., Krawczyk, S., Souteyrand, E., Cloarec, J.P., Chevolot, Y., 2008a. *Sens. Actuators B Chem* 128(2), 552-559.
- Mazurczyk, R., El Khoury, G., Dugas, V., Hannes, B., Laurenceau, E., Cabrera, M., Krawczyk, S., Souteyrand, E., Cloarec, J.P., Chevolot, Y., 2008b. *Sensors and Actuators B-Chemical* 128(2), 552-559.
- McDonnell, J.M., 2001. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(5), 572-577.
- Mitchell, E., Houles, C., Sudakevitz, D., Wimmerova, M., Gautier, C., Perez, S., Wu, A.M., Gilboa-Garber, N., Imberty, A., 2002. *Nat. Struct. Biol.* 9(12), 918-921.
- Mochalova, L., Kurova, V., Shtyrya, Y., Korchagina, E., Gambaryan, A., Belyanchikov, I., Bovin, N., 2007. *Arch. Virol.* 152, 2047-2057.
- Mochalova, L.V., Korchagina, E.Y., Kurova, V.S., Shtyria, J.A., Gambaryan, A.S., Bovin, N.V., 2005. *Anal. Biochem.* 341(1), 190-193.
- Monds, R.D., O'Toole, G.A., 2009. *Trends Microbiol.* 17(2), 73-87.
- Morvan, F., Meyer, A., Jochum, A., Sabin, C., Chevolot, Y., Imberty, A., Praly, J.P., Vasseur, J.J., Souteyrand, E., Vidal, S., 2007. *Bioconjug. Chem.* 18(5), 1637-1643.
- Morvan, F., Vidal, S., Souteyrand, E., Chevolot, Y., Vasseur, J.-J., 2012. *Rsc Advances* 2(32), 12043-12068.

- Mujumdar, R.B., Ernst, L.A., Mujumdar, S.R., Lewis, C.J., Waggoner, A.S., 1993. *Bioconjug. Chem.* 4(2), 105-111.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2009. *Medical Microbiology*, 6th Edition, Mosby.
- Niemeyer, C.M., Adler, M., Pignataro, B., Lenhert, S., Gao, S., Chi, L.F., Fuchs, H., Blohm, D., 1999a. *Nucleic Acids Res.* 27(23), 4553-4561.
- Niemeyer, C.M., Boldt, L., Ceyhan, B., Blohm, D., 1999b. *Anal. Biochem.* 268(1), 54-63.
- Nurisso, A., Blanchard, B., Audfray, A., Rydner, L., Oscarson, S., Varrot, A., Imberty, A., 2010. *J. Biol. Chem.* 285(26), 20316-20327.
- Otsuka, I., Blanchard, B., Borsali, R., Imberty, A., Kakuchi, T., 2010. *ChemBioChem* 11(17), 2399-2408.
- Park, S., Lee, M.-R., Shin, I., 2009a. *Bioconjug. Chem.* 20(1), 155-162.
- Park, S., Lee, M.R., Pyo, S.J., Shin, I., 2004. *J. Am. Chem. Soc.* 126(15), 4812-4819.
- Park, S., Shin, I., 2007. *Org. Lett.* 9(9), 1675-1678.
- Park, S., Sung, J.W., Shin, I., 2009b. *Acs Chemical Biology* 4(9), 699-701.
- Park, S.J., Shin, I.J., 2002. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41(17), 3180-+.
- Pertici, F., Pieters, R.J., 2012. *Chem. Commun.* 48, 4008-4010.
- Phaner-Goutorbe, M., Dugas, V., Chevlot, Y., Souteyrand, E., 2011. *Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications* 31(2), 384-390.
- Pillet, F., Thibault, C., Bellon, S., Maillart, E., Trevisiol, E., Vieu, C., Francois, J.M., Leberre, V.A., 2010. *Sensors And Actuators B-Chemical* 147(1), 87-92.
- Popplewell, J.F., Swann, M.J., Ahmed, Y., Turnbull, J.E., Fernig, D.G., 2009. *ChemBioChem* 10(7), 1218-1226.
- Pourceau, G., Chevlot, Y., Goudot, A., Giroux, F., Meyer, A., Moules, V., Lina, B., Cecioni, S., Vidal, S., Yu, H., Chen, X., Ferraris, O., Praly, J.-P., Souteyrand, E., Vasseur, J.-J., Morvan, F., 2011. *ChemBioChem* 12(13), 2071-2080.
- Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J.J., Morvan, F., 2008. *J. Org. Chem.* 73(15), 6014-6017.
- Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J.J., Morvan, F., 2009. *J. Org. Chem.* 74(17), 6837-6842.
- Qavi, A.J., Washburn, A.L., Byeon, J.Y., Bailey, R.C., 2009. *Anal Bioanal Chem* 394(1), 121-135.
- Ratner, D.M., Adams, E.W., Su, J., O'Keefe, B.R., Mrksich, M., Seeberger, P.H., 2004. *ChemBioChem* 5(3), 379-382.
- Rella, R., Spadavecchia, J., Manera, M.G., Siciliano, P., Santino, A., Mita, G., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 20(6), 1140-1148.
- Reynolds, M., Marradi, M., Imberty, A., Penad, S., Perez, S., 2012. *ChemistryChemistry-A European Journal* 18, 4264 – 4273.
- Sabin, C., Mitchell, E.P., Pokorna, M., Gautier, C., Utile, J.-P., Wimmerova, M., Imberty, A., 2006. *FEBS Lett.* 580, 982-987.
- Sadhu, K.K., Roethlingshoefer, M., Winssinger, N., 2013. *Isr. J. Chem.* 53(1-2), 75-86.
- Sam, S., Touahir, L., Andresa, J.S., Allongue, P., Chazalviel, J.N., Gouget-Laemmel, A.C., de Villeneuve, C.H., Moraillon, A., Ozanam, F., Gabouze, N., Djebbar, S., 2010. *Langmuir* 26(2), 809-814.

- Samanta, D., Sarkar, A., 2010. *Chemical Society Reviews*, 1-26.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *J. Bacteriol.* 184(4), 1140-1154.
- Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B.I., 1999. *Microbiologie et pathologie infectieuse*.
- Schena, M., 2002. *Microarray Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Seeberger, P.H., 2008. *Carbohydr. Res.* 343(12), 1889-1896.
- Seeberger, P.H., de Paz, J.L., Noti, C., 2006. *J. Am. Chem. Soc.* 128(9), 2766-2767.
- Seeberger, P.H., Werz, D.B., 2007. *Nature* 446(7139), 1046-1051.
- Seo, J.H., Kim, C.S., Hwang, B.H., Cha, H.J., 2010. *Nanotechnology* 21(21).
- Sharma, P., Basir, S.F., Nahar, P., 2010. *J. Colloid Interface Sci.* 342(1), 202-204.
- Sharon, N., 2006. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1760(4), 527-537.
- Sharon, N., Lis, H., 2004. *Glycobiology* 14(11), 53R-62R.
- Shin, I., Park, S., Lee, M.R., 2005. *Chemistry-A European Journal* 11(10), 2894-2901.
- Sicard, D., Cecioni, S., Iazykov, M., Chevotot, Y., Matthews, S.E., Praly, J.-P., Souteyrand, E., Imberty, A., Vidal, S., Phaner-Goutorbe, M., 2012. *Chem. Commun.* 47(33), 9483-9485.
- Siegel, G., Schmidt, A., Schaefer, P., Malmsten, M., Ringstad, L., Winkler, K., Just, S., 2009. *Engineering In Life Sciences* 9(5), 363-375.
- Sjoback, R., Nygren, J., Kubista, M., 1995. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular And Biomolecular Spectroscopy* 51(6), L7-L21.
- Smith, E.A., Thomas, W.D., Kiessling, L.L., Corn, R.M., 2003. *J. Am. Chem. Soc.* 125(20), 6140-6148.
- Stettler, A.R., Schwarz, M.A., 2005. *J. Chromatogr. A* 1063(1-2), 217-225.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., Wilson, I.A., 2006. *Science* 312(5772), 404-410.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. *Lancet* 358(9276), 135-138.
- Stoitsova, S.R., Boteva, R.N., Doyle, R.J., 2003. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1619(2), 213-219.
- Sulak, O., Cioci, G., Lameignère, E., Balloy, V., Round, A., Gutsche, I., Malinowska, L., Chignard, M., JKosma, P., Aubert, D.F., Marolda, C.L., Valvano, M.A., Wimmerova, M., Imberty, A., 2011. *PLoS Pathogens* 7(9).
- Tan, W.H., Wang, K.M., Drake, T.J., 2004. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8(5), 547-553.
- Terashima, H., Kojima, S., Homma, M., 2008. *Flagellar Motility In Bacteria: Structure And Function Of Flagellar Motor*. *International Review Of Cell And Molecular Biology*, Vol 270, ed., pp. 39-85.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16(1-2), 121-131.
- Tort, N., Salvador, J.P., Avino, A., Eritja, R., Comelles, J., Martinez, E., Samitier, J., Marco, M.P., 2012. *Bioconjug. Chem.* 23(11), 2183-2191.
- Utsumi, T., Ide, A., Funatsu, G., 1989. *FEBS Lett.* 242(2), 255-258.
- Varki, A., 2007. *Nature* 446(7139), 1023-1029.

- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., 1999. *Essentials of Glycobiology*, First ed.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., 2009. *Essentials of Glycobiology*, second ed.
- Vaubourdolle, M., 2001. *Pharmacie-Biologie Préparation à l'internat_Infectiologie Tome 5, 2ème édition.*
- Velasco-Garcia, M.N., 2009. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20(1), 27-33.
- von Itzstein, M., 2007. *Nature* 6(12), 967-974.
- Wang, C., Yan, Q., Liu, H.-B., Zhou, X.-H., Xiao, S.-J., 2011. *Langmuir* 27(19), 12058-12068.
- Wang, D.N., 2003. *Proteomics* 3(11), 2167-2175.
- Wang, D.N., Liu, S.Y., Trummer, B.J., Deng, C., Wang, A.L., 2002. *Nat. Biotechnol.* 20(3), 275-281.
- Wang, R.H., Tombelli, S., Minunni, M., Spiriti, M.M., Mascini, M., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 20(5), 967-974.
- Wangkam, T., Srihirin, T., Wanachantararak, P., Baxi, V., Sutapun, B., Amarit, R., 2009. *Sensors And Actuators B-Chemical* 139(2), 274-279.
- Werz, D.B., Seeberger, P.H., 2005. *Chemistry-A European Journal* 11(11), 3194-3206.
- Willats, W.G.T., Rasmussen, S.E., Kristensen, T., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., 2002. *Proteomics* 2(12), 1666-1671.
- Wink, T., vanZuilen, S.J., Bult, A., vanBennekom, W.P., 1997. *Analyst* 122(4), R43-R50.
- Winsor, G.L., Lam, D.K.W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R.E.W., Brinkman, F.S.L., 2011. *Nucleic Acids Res.* 39, D596-D600.
- Wood, R.W., 1902. *Proceedings of the Physical Society* 18, 269.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C., Doring, G., 2002. *J. Clin. Invest.* 109(3), 317-325.
- Yoshioka, K., Sato, Y., Murakami, T., Tanaka, M., Niwa, O., 2010. *Analytical Chemistry* 82, 1175-1178.
- Yu, X.B., Xu, D.K., Cheng, Q., 2006. *Proteomics* 6(20), 5493-5503.
- Zhang, J., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Praly, J.P., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Morvan, F., Chevlot, Y., 2009a. *Biosens. Bioelectron.* 24(8), 2515-2521.
- Zhang, J., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Praly, J.P., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Morvan, F., Chevlot, Y., 2009b. *Chem. Commun.*(44), 6795-6797.
- Zhang, Y., Li, Q., Rodriguez, L.G., Gildersleeve, J.C., 2010. *J. Am. Chem. Soc.* 132(28), 9653-9662.
- Zhi, Z.-L., Laurent, N., Powel, A.K., Karamanska, R., Fais, M., Voglmeir, J., Wright, A., Blackburn, J.M., Crocker, P.R., Russell, D.A., Flitsch, S., Field, R.A., Turnbull, J.E., 2008. *ChemBioChem* 9(10), 1568-1575.
- Zhou, X., Turchi, C., Wang, D., 2009. *Journal Of Proteome Research* 8(11), 5031-5040.
- Zhou, X., Zhang, J., Wang, D., 2012. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 808, 401-411.
- Zhou, X.C., Zhou, J.H., 2006. *Biosens. Bioelectron.* 21(8), 1451-1458.

Zou, L., Pang, H.-L., Chan, P.-H., Huang, Z.-S., Gu, L.-Q., Wong, K.-Y., 2008. Carbohydr. Res. 343(17), 2932-2938.

Liste des publications et communications

Liste des publications

[1-8]

- [1] G. Pourceau, Y. Chevolut, A. Goudot, F. Giroux, A. Meyer, V. Moules, B. Lina, S. Cecioni, S. Vidal, H. Yu, X. Chen, O. Ferraris, J.-P. Praly, E. Souteyrand, J.-J. Vasseur, and F. Morvan, "Measurement of Enzymatic Activity and Specificity of Human and Avian Influenza Neuraminidases from Whole Virus by Glycoarray and MALDI-TOF Mass Spectrometry," *Chembiochem*, vol. 12, pp. 2071-2080, 2010.
- [2] Y. Chevolut, J. Zhang, A. Meyer, A. Goudot, S. Rouanet, S. Vidal, G. Pourceau, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, E. Souteyrand, J.-J. Vasseur, and F. Morvan, "Multiplexed binding determination of seven glycoconjugates for *Pseudomonas aeruginosa* Lectin I (PA-IL) using a DNA-based carbohydrate microarray," *Chemical Communications*, vol. 47, pp. 8826-8828, 2011.
- [3] F. Morvan, B. Gerland, G. Pourceau, A. Goudot, A. Meyer, S. Vidal, Y. Chevolut, J.-P. Praly, E. Souteyrand, and J.-J. Vasseur, "Oligonucleotide glyco-centered galactosyl cluster conjugates synthesized by multiclick and phosphoramidite chemistries and their affinity for *Pseudomonas aeruginosa* lectin 1," *Collection symposium series on chemistry of nucleic acid components*, vol. 12, pp. 148-151, 2011.
- [4] D. Charrier, Y. Chevolut, J. P. Cloarec, A. Goudot, T. Géhin, C. Roux, V. Dugas, S. Vidal, J. J. Vasseur, F. Morvan, and E. Souteyrand, "Photopotential imaging on functionalized surfaces dedicated to label-free detection of biomolecular interactions," *Procedia Engineering Euroensors*, vol. 25, pp. 932-935, 2011.
- [5] A. Goudot, J. Zhang, G. Pourceau, A. Meyer, J. P. Cloarec, S. Rouanet, S. Vidal, J. J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolut, and E. Souteyrand, "Oligosaccharides-protein interaction study using microarrays with DDI immobilization," *Procedia Engineering Euroensors*, vol. 25, pp. 1553-1556, 2011.
- [6] B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, V. Dugas, S. Vidal, E. Souteyrand, J. J. Vasseur, Y. Chevolut, and F. Morvan, "Synthesis of a library of sixteen fucosylated glycoclusters and determination of their binding towards *Pseudomonas Aeruginosa* lectin B (PA-III) using DNA-based carbohydrate microarray," *Bioconjugate Chemistry*, 2012.
- [7] B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, E. Souteyrand, J. J. Vasseur, Y. Chevolut, and F. Morvan, "Synthesis of Homo and hetero-functionalized glycoclusters and binding to *Pseudomonas aeruginosa* lectins (PA-IL and PA-III) monitored by a DNA-based carbohydrate microarray," *Journal of Organic Chemistry*, 77(17) 7620-7616, 2012.
- [8] A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, T. Gehin, S. Vidal, J. J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand and Y. Chevolut, "Quantitative analysis (K_d and IC_{50}) of glycoconjugates interactions with a bacterial lectin on a carbohydrate microarray with DNA Direct Immobilization (DDI)," *Biosensors and Bioelectronics*, 2013.

Communications scientifiques

- [1] J. Zhang, G. Pourceau, A. Goudot, A. Meyer, S. Vidal, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan and Y. Chevolot, "Glycobiology: lectines/glycomimetics interactions studied with DNA chips used as universal platform" (**Poster**), *3ème colloque du LIA « Nanotechnologies & Nanosystèmes »*, Sherbrooke, Canada - 12-16 juillet 2010.
- [2] Y. Chevolot, J. Zhang, G. Pourceau, A. Goudot, L. Moni, A. Meyer, S. Vidal, A. Dondoni, J-P. Praly, A. Marra, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan, "Glycomimetics/lectins interactions : DNA Directed Immobilization, a screening tool" (**Conférence invitée**), *SBCN*, Ecully, France - 19-22 octobre 2010.
- [3] A. Goudot, G. Pourceau, F. Giroux, A. Meyer, V. Moules, B. Lina, S. Cecioni, S. Vidal, H. Yu, X. Chen, O. Ferrari, J-P. Praly, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "Measurement of enzymatic activity and specificity of human and avian influenza neuraminidases from whole virus by glycoarray and MALDI-TOF mass spectrometry" (**Poster**), *SBCN*, Ecully, France - 19-22 octobre 2010.
- [4] A. Goudot, G. Pourceau, S. Vidal, S. Cecioni, V. Moules, F. Giroux, B. Lina, H. Yu, X. Chen, O. Ferrari, J-P. Praly, A. Meyer, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "Développement d'une puce à oligosaccharides pour étudier la spécificité de la Neuraminidase du virus de la grippe" (**Communication orale**), *14ème Journée Scientifique du Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences*, Lyon, France, 25 novembre 2010.
- [5] G. Pourceau, A. Goudot, J. Zhang, F. Giroux, A. Meyer, V. Moules, B. Lina, S. Cecioni, S. Vidal, A. Dondoni, H. Yu, O. Ferrari, L. Moni, A. Marra, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolot, "DNA Glycomimetics and DNA Directed Immobilization based Glycoarray. In Carbohydrate chemistry: From synthesis to applications" (**Communication orale**), *European young investigator workshop*, Lyon, 11-15 Avril 2011
- [6] B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, S. Cecioni, S. Vidal, Y. Chevolot, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan, "Conception de glycomimétiques poly-L-fucose et évaluation de leur affinité vis-à-vis de la lectine II de *Pseudomonas aeruginosa*" (**Communication orale**) *Glucidoc 2011*, Sète, France, 3-6 mai 2011.
- [7] A. Goudot, Y. Chevolot, J. Zhang, A. Meyer, S. Rouanet, S. Vidal, G. Pourceau, J-P. Cloarec, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan, "DNA directed immobilization of glycomimetics for glycoarrays application: multiplexed binding determination of seven glycoconjugates for PA-IL" (**Poster**) *JRAB 2011 "Journée Rhône-Alpes des Biomolécules"*, Lyon, France, 27 mai 2011.
- [8] A. Goudot, G. Pourceau, S. Vidal, S. Cecioni, V. Moules, F. Giroux, B. Lina, H. Yu, X. Chen, O. Ferrari, J-P. Praly, A. Meyer, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "Développement d'une puce à oligosaccharides" (**Communication orale**), *CRIEC 2011 « Colloque de Recherche Intergroupe Ecoles Centrales »*, Paris, France, 14-17 juin 2011.

- [9] F. Morvan, B. Gerland, G. Pourceau, A. Goudot, A. Meyer, S. Vidal, Y. Chevolut, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, "Oligonucleotide glyco-centered galactosyl cluster conjugates synthesized by multiclick and phosphoramidite chemistries and their affinity for *Pseudomonas aeruginosa* Lectin 1" (**Communication orale**) XVth *Symposium on chemistry of nucleic acid components*, Cesky Krumlov, République Tchèque, 5-10 juin 2011.
- [10] B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, S. Cecioni, S. Vidal, Y. Chevolut, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan, "Conception de glycomimétiques poly-L-fucose et évaluation de leur affinité vis-à-vis de la lectine II de *Pseudomonas aeruginosa*", (**Communication orale**), 6^{ème} *journées de l'école doctorale 459 Sciences Chimiques Balard*, Montpellier, France, 11-12 juillet, 2011.
- [11] A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, J. Zhang, S. Rouanet, S. Vidal, J-P. Cloarec, J-J. Vasseur, E. Souteyrand, F. Morvan, Y. Chevolut, "Multiplexed binding determination of seven glycoconjugates, immobilized by DDI and sorting on a DNA microarray, for PA-IL" (**Communication orale**) 4^{ème} *colloque du Laboratoire International Associé : Nanotechnologies & Nanosystèmes*, 10-13 juillet 2011, Allevard-les-Bains France.
- [12] A. Goudot, J. Zhang, G. Pourceau, A. Meyer, S. Cecioni, S. Vidal, H. Yu, X. Chen, J-P. Praly, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolut, "Oligosaccharides-protein interaction study (detection and IC₅₀ measurement assay) using microarrays with DDI immobilisation" (**Communication orale**), *Euroensors XXV*, Athènes, Grèce, 4-7 septembre 2011.
- [13] D. Sicard, S. Cecioni, A. Goudot, Y. Chevolut, S. Vidal, E. Souteyrand, M. Phaner-Goutorbe, "Glycoconjugate/Protein interaction: An AFM study with *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-IL" (**Poster**), *Biosensors*, Cancun, Mexique, 15-18 mai 2012.
- [14] A. Goudot, G. Pourceau, S. Rouanet, A. Meyer, S. Vidal, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolut, "Quantitative analysis (K_d and IC₅₀) of glycoconjugates interactions with a bacterial lectin on a carbohydrate microarray with DNA Direct Immobilization (DDI)" (**Communication orale**), *Biosensors*, Cancun, Mexique, 15-18 mai 2012.
- [15] F. Morvan, A. Goudot, C. Ligeour, A. Meyer, S. Vidal, Y. Chevolut, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, "DNA glycomimétiques : Utilisation de la chimie des acides nucléiques pour la synthèse de glycomimétiques" (**Communication orale**), 24^{ème} *Journées du Groupement Français des Glycosciences*, Val Joly, France, 21-25 mai 2012.
- [16] A. Goudot, G. Pourceau, S. Rouanet, A. Meyer, S. Vidal, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolut, "Analyse quantitative (K_d and IC₅₀) des interactions glycoconjugués-protéines sur biopuce pour la recherche d'un traitement pour les patients atteints de la mucoviscidose" (**Communication orale**), *CRIEC 2012*, « *Colloque de Recherche Inter groupe Ecoles Centrales* », Marseille, France, 11-15 juin 2012.

- [17] A. Goudot, G. Pourceau, S. Vidal, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "A la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques" (**Communication orale**), Bio-ECL2012, « *La Bio-ingénierie à l'école Centrale de Lyon* », Ecully, France, 04 octobre 2012.
- [18] A. Goudot, G. Pourceau, S. Vidal, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "Développement d'un microsysteme pour la recherche de molécules anti-infectieuses: Cas de *Pseudomonas Aeruginosa*" (**Communication orale**), JDD2012, « *La journée des doctorants de l'INL* », Ecully, France, 18-19 octobre 2012.
- [19] A. Goudot, B.Gerland, C.Ligeour, D.Sicard, G. Pourceau, O. Vidal, M. Phaner-Goutorbe, A. Meyer, T. Gehin, S. Vidal, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "DDI (DNA Directed Immobilization) based Glycoarray for measuring glycoclusters lectin interaction affinity" (**Poster**) JRAB 2013 "*Journée Rhône-Alpes des Biomolécules* », Lyon, France, 07 juin 2013.
- [20] A. Goudot, C.Ligeour, M. Phaner-Goutorbe, B.Gerland, D.Sicard, G. Pourceau, A. Meyer, T. Gehin, S. Vidal, J-J. Vasseur, F. Morvan, E. Souteyrand, Y. Chevolot, "DDI (DNA Directed Immobilization) based Glycoarray for measuring glycoclusters lectin interaction affinity" (**Poster**) GRC 2013 "*Gordon Research Conferences* », Mount Snow Resort, Etats-Unis, 17-21 juin 2013.

Brevets scientifiques

- [1] François MORVAN, Jean-Jacques VASSEUR, Olivier VIDAL, Alice GOUDOT, Caroline LIGEOUR, Sébastien VIDAL, Yann CHEVOLOT, Eliane SOUTEYRAND, « *Glycomimétiques anti adhésifs de Pseudomonas aeruginosa* », (**en cours**), 2013

Auteur : Alice GOUDOT

Année : 2013

Résumé : *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est l'un des principaux germes impliqués dans les maladies nosocomiales et est aussi la principale cause de mortalité et morbidité des patients atteints de la mucoviscidose malgré l'utilisation massive d'antibiotiques. Dans la lutte contre PA, une alternative aux antibiotiques est l'inhibition de ses facteurs de virulence notamment ceux impliqués dans l'adhésion et la formation du biofilm via des interactions de type sucres/protéines. Ces protéines sont appelées lectines (PA-IL, PA-IIL, FliD).

L'objectif de ce travail est la recherche de molécules inhibitrices (glycoclusters) de ces lectines impliquées dans la virulence de PA. Compte tenu du grand nombre de glycoclusters à tester et des faibles quantités de matériels biologiques disponibles, un outil de criblage innovant a été développé (glycoarray) à partir d'une lame de verre microstructurée et fonctionnalisée chimiquement afin d'immobiliser de manière organisée et ordonnée les glycoclusters. La méthode d'immobilisation choisie est la méthode d'immobilisation spécifique par hybridation de l'ADN appelée DDI : DNA Directed Immobilization. Sur ces glycoarrays, 3 méthodes indépendantes (lecture de fluorescence directe, IC_{50} et K_d) de mesure des interactions glycoclusters/lectines ont été mises au point et validées par une étude comparative donnant un classement similaire des glycoclusters pour leur affinité vis-à-vis des lectines. Il faut noter que ces mesures faites sur glycoarrays ne consomment que quelques picomoles de glycoclusters comparées aux méthodes classiques (ITC, ELLA, RMN, ...) qui nécessitent des micromoles de produits.

A l'aide de ces glycoarrays, un criblage d'une bibliothèque d'une centaine de glycoclusters multivalents, de différentes topologies, charges et linkers a permis d'identifier deux structures montrant une très forte affinité vis-à-vis des lectines de PA. Ces glycoclusters sont actuellement en test *in vitro* et *in vivo*.

Ces études d'interactions sur DDI-glycoarray ont été étendues à d'autres agents pathogènes tels que les bactéries *Burkholderia ambifaria*, *Viscum album* ou contre le virus de la grippe.

Dans le futur, pour mieux appréhender les mécanismes d'interactions sucres/protéines, il serait intéressant de pouvoir suivre en temps réel ces interactions en utilisant des systèmes de détection sans marquage tel que, par exemple, la résonance plasmonique de surface. Aussi, le dernier chapitre donne les prémices d'une adaptation de la méthode DDI sur glycoarray sur surface d'or.

Mots-clés : Glycobiologie, interaction glycocluster/lectine, Glycoarray, chimie de surface, immobilisation dirigée par l'ADN (DDI)

Title: Glycoarray technology development for new anti-infective molecules discovering: applications to *Pseudomonas aeruginosa*.

Summary: *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is one of the predominant bacterium encountered in nosocomial infections. PA infections often lead to chronic inflammation and eventually to death despite aggressive antibiotic therapy. A promising approach is to inhibit the virulence factors of PA such as PA-IL, PA-IIL, FliD (lectins). Therefore, there is a great interest for studying carbohydrate/lectin interactions in order to design new treatments.

The goal of this work is the research for inhibitory molecules (glycoclusters) of these lectins involved in the virulence of PA. An innovative screening tool for studying carbohydrate/lectin interactions has been developed (glycoarray). Glycoarray are microstructured glass-slides, chemically functionalized in order to immobilize, organized and orderly, glycoclusters at the surface.

The immobilization method is the specific immobilization method based on DNA hybridization called DDI (DNA Directed Immobilization). This miniaturized analytical biosystem allows multiplex test performed in one single microwell. Moreover, three independent methods of affinity measurement (direct fluorescence read-out, IC_{50} and K_d) have been developed and validated by a comparative study giving a similar ranking of glycoclusters for their affinity towards PA-IL. These measurements on glycoarrays consume only a few picomoles glycoclusters compared to conventional methods (ITC, ELLA...) that require micromoles of products.

Using these glycoarrays, the screening of a library of hundreds of glycoclusters presenting different topologies, multivalencies, charges and linkers led to the identification of two structures showing a very strong affinity for PA lectins. These glycoclusters are currently *in vitro* assay and *in vivo*.

These interaction studies on DDI-glycoarray were extended to other pathogens such as *Burkholderia ambifaria* bacteria, *Viscum album* or against the influenza virus.

In the future, to better understand the mechanisms of sugar / protein interactions, it would be interesting to monitor in real time the interactions using label-free detection systems such as, for example, the surface plasmon resonance (SPR). Also, the last chapter gives the beginnings of an adaptation of the method of DDI glycoarray on gold surface

Key words: Glycobiology, glycocluster/lectin interaction, Glycoarray, surface chemistry, DNA directed immobilization (DDI)