HAL
open science

Validation et criblage de nouvelles molécules anti-infectieuses sur microarray : applications à Pseudomonas aeruginosa

Lucie Dupin

▶ **To cite this version:**

Lucie Dupin. Validation et criblage de nouvelles molécules anti-infectieuses sur microarray : applications à Pseudomonas aeruginosa. Autre. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSEC018 . tel-01475008

HAL Id: tel-01475008

https://theses.hal.science/tel-01475008v1

Submitted on 23 Feb 2017

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

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

N° d'ordre : 2016LYSEC018

ECOLE CENTRALE DE LYON

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Ecole Doctorale : Electronique, Electrotechnique et Automatique

Spécialité : Ingénierie pour le vivant

Par

Lucie Dupin

Validation et criblage de nouvelles molécules anti-infectieuses sur microarray : applications à *Pseudomonas aeruginosa*.

Thèse préparée à l'INL-Ecole Centrale de Lyon
Sous la direction de Yann Chevolot
Codirigée par Eliane Souteyrand

Soutenue publiquement le 30/05/2016 devant la commission d'examen composée par :

Dr. Rabah Boukherroub	Directeur de recherche CNRS - IEMN - USTL - Lille	**Rapporteur**
Pr. Olivier Renaudet	Professeur - DCM - UJF - Grenoble	**Rapporteur**
Dr. Benoît Darblade	Directeur innovation et partenariats - ELICITYL - Crolles	**Examinateur**
Pr. Gérard Vergoten	Professeur - UGSF - USTL - Lille	**Examinateur**
Dr. Jean-Jacques Vasseur	Directeur de recherche CNRS - IBMM - UM2 - Montpellier	**Examinateur**
Dr. Yann Chevolot	Directeur de recherche CNRS - INL - ECL - Lyon	**Directeur**

Remerciement

Je souhaite, tout d'abord, remercier M. Frank DEBOUCK, directeur de l'Ecole Centrale de Lyon, Dr. Catherine BRU-CHEVALLIER et Dr. Christian SEASSAL, directrice et directeur adjoint de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon ainsi que Dr. Gérard SCORLETTI, directeur de l'école doctorale EEA pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

Je remercie aussi tous les membres de mon jury de thèse pour avoir évalué ce travail. Tout d'abord, Dr. Jean-Jacques VASSEUR pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie également les rapporteurs, Pr. Olivier RENAUDET et Dr. Rabah BOUKHERROUB, pour nos échanges lors de la soutenance et vos conseils avisés pour perfectionner ce manuscrit. Un grand merci aux examinateurs de cette thèse Dr. Benoît DARBLADE et Pr. Gérard VERGOTEN pour avoir été disponibles et avoir répondu à mes nombreuses questions. Gérard, je te remercie aussi de m'avoir accueillie pendant une semaine à Lille pour me transmettre ton savoir sur la modélisation moléculaire et pour le petit « détour » par Bruges et la mer du Nord !

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement Dr. Yann CHEVOLOT et Dr. Eliane SOUTEYRAND, directeur et co-directrice de cette thèse. Je vous remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir offert la possibilité d'effectuer une thèse après quelques mois effectués au laboratoire en tant qu'ingénieur d'études. Je vous remercie également pour la confiance que vous m'avez accordée et pour m'avoir intégrée dans deux projets de recherche ANR. Un grand merci Eliane pour tous tes conseils très judicieux, pour ta bonne humeur et toutes tes petites anecdotes qui nous manquent depuis ton départ en retraite. Yann, je te remercie vivement pour ton aide au quotidien, ta disponibilité et ta bienveillance à mon égard. Je te remercie aussi pour tous les échanges scientifiques que nous avons pu avoir et pour tes nombreux conseils.

Je souhaite aussi souligner que j'ai eu la chance de participer à un projet pluridisciplinaire impliquant quatre laboratoires et une société et que sans toutes ces collaborations, ce travail n'aurait pas été possible. J'adresse donc mes remerciements à chacun des membres de ce projet : Dr. Sébastien Vidal de l'ICBMS à Lyon, Dr. Benoît DARBLADE d'ELICITYL à Crolles, Dr. François Morvan, Dr. Jean-Jacques VASSEUR et Albert MEYER de l'IBMM à Montpellier ainsi que Dr. Olivier VIDAL et Pr. Gérard VERGOTEN de l'UGSF à Lille. Je remercie aussi grandement les Montpelliérains Dr. Francesca CASONI, Anthony ANGELI, Mathieu NOEL et Mimouna MADAOUI ainsi que Dr. Shuai WANG de l'ICBMS. Francesca, je garde un très bon souvenir de notre colocation au RECOB et Anthony, j'espère ne pas t'avoir traumatisé lors de ta semaine au labo ! Je retiens aussi les réunions ANR (PA-Control et Glycomime) qui étaient toujours très riches en discussions, qui bouillonnaient d'idées et permettaient de se rendre compte de l'avancement du projet avec des présentations toujours très claires malgré les spécialités de chacun. Et tout cela, toujours dans la bonne humeur ! Je vous remercie aussi pour votre aide et pour avoir toujours été disponibles pour répondre à mes questions. Je retiendrai bien sûr les blagues de Gérard (du moins j'essaye pour pouvoir les redire !), une certaine photo devant le Carlton et les bons petits repas partagés ensemble.

Un très très grand merci à tous les membres de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'INL dans laquelle j'ai été accueillie pour ces trois ans. Ce fut très agréable de travailler avec vous, d'échanger scientifiquement et d'apprendre à vos côtés… J'ai également énormément apprécié tous les moments de convivialité passés ensemble, à la fameuse pause café de 10 h, les repas de Noël, barbecues d'été, … Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous et pour cela je vous remercie ! En commençant par les permanents, merci à Yann CHEVOLOT pour les nombreuses discussions autour de divers sujets comme le vin, la Bretagne, les chiens de traineau,… ; à Eliane pour le punch de Noël et tes nombreuses anecdotes ! Merci à Emmanuelle LAURENCEAU pour ton aide avec les protéines et ton rire que l'on entend à l'autre bout du couloir ; à Magali PHANER-GOUTORBE pour les anecdotes des relations internationales ;-) ; à Virginie MONNIER pour ta gentillesse, pour les bons plans partagés (randos, livres, …) et pour être venue à ma rescousse pour un fameux TP ! ; à Jean-Pierre CLOAREC pour les discussions sur l'enseignement et tes petites blagues ; à Isabel NABETH pour ton aide au labo, les bons

plans recettes, fromages … et les petits plats partagés (merci aussi à ton mari !) ; à Maryline DISERIO pour ton aide dans les commandes, tes fous rires mémorables et les bons plans pour aller courir et à Guy STREMSDOERFER de nous faire partager ton expérience avec beaucoup de passion. Et enfin, un grand merci à mon super compère de bureau Thomas GEHIN (qui me faisait peur au début !) pour ton aide indispensable au labo, tes bons conseils, … mais aussi pour tes « râleries » quotidiennes, ton vaporisateur à toi et pour m'avoir décerné le titre de super secrétaire !!! Je tiens aussi à fortement remercier tous les non permanents du labo, doctorants et ATER, avec qui j'ai passé de supers moments au labo mais aussi à l'extérieur ! Tout d'abord merci à Alice GOUDOT pour m'avoir accueillie et transmis ton savoir à mon arrivée au labo, et pour ton dynamisme et ta sympathie, à Amandine CORNILLON, drômoise tout comme moi et voisine de paillasse d'une extrême gentillesse, à Francisco PALAZON pour ta super huile d'olive trop bonne, à Liu SHI, ma Chinoise préférée, pour ton super sens de l'humour, tes cours de cuisine (ravioli et nem) et la semaine passée ensemble à Lisbonne (surtout pour m'avoir supportée dans l'avion !) ; à Maxime BOKSEBELD, l'électron libre du labo, pour les longues discussions autour de sujets scientifiques et autres, pour ta minute Maxime du café et tes supers tartiflettes !! (et digestifs !) ; à Francesca ZUTTION, mon Italienne préférée, pour les manip AFM, ton aide avec la modélisation, les échanges autour de nos projets de thèse, … mais aussi pour s'être remontées le moral, pour tes supers Tiramisu et les soirées « surprises » avec les baby Guinness !!! ; à Mathieu CAILLAU (le parigot), pour tes nombreuses blagues ;-), pour ton extrême patience le midi (entouré que de filles) et ta connaissance développée des people ! ; à Salomé ANSANAY-ALEX, savoyarde de la Haute, pour ta super aide avec Word pendant la rédaction, ton sens de l'humour, tes bons conseils et les bons plans fromages !! ; à Marie GALVIN pour ton rire, le tricot et notre passion pour la kinésithérapie ! ; à Feixong CHEN, Jian ZHANG et Muchen LI pour nos échanges autour de la culture chinoise et française. Plus particulièrement, Muchen, je te souhaite le meilleur dans la suite de ce projet ! Je vous souhaite également à tous une bonne continuation dans vos projets respectifs !
Je souhaite aussi remercier tous les membres de l'INL, notamment la plateforme NanoLyon (Radeck, Pierre et Jean-Louis), le personnel administratif et informatique (Martine, Thérèse, Sylvie, Emmanuelle, Patricia, Laurent et Raphaël) sans qui j'aurai bien des fois été perdue !

Un très grand merci à mes amis lyonnais, drômois, suisses et clermontois pour avoir toujours été là ! Spécial dédicace à Baptiste, Loreline, Thiloude, Edith, Ophé et Sarah (pour la larmichette et le Repos et Détente !!!) pour avoir été là le jour J. Un grand merci à tous les autres qui je le sais m'ont accompagné par la pensée : Simone, Laetitia, Mathilde, Mojito, Benoit, Aline, Cécile, Julie, Jean-Ré, Catarina, Virginie, Mélanie, Marion, Vinini, Nico, Arsouille, Chichi, Arnaud, Olivier, Greg, … Ne changez rien, vous êtes au top !

Je tiens très fortement à remercier également toute ma famille (oncles, tantes, cousins, cousines) pour m'avoir entourée, encouragée et supportée pendant cette thèse ! Merci à tatie Josie, Marcel, ma marraine Lydie, Fred et Catherine pour avoir été à mes côtés ! Merci aussi à ma belle-famille de m'avoir aussi fortement soutenus avec vos nombreux messages et à Danielle et Dominique d'avoir été là ! Une pensée à mes grands-parents et à Monique qui je l'espère auraient été fiers de moi ! Papa, Maman, un très grand merci pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix, pour les valeurs que vous m'avez inculquées, sans vous je n'aurai pas réussi ! Et enfin, un grand merci du fond du cœur à Jérémy pour m'avoir encouragée pendant ces trois ans allant même jusqu'à me faire répéter à chaque présentation importante et à relire ma thèse ! Pour m'avoir toujours soutenue, supportée et pour me rendre heureuse au quotidien. :-)

Bonne continuation à tous.

Table des matières

Table des matières i

Listes des figures ix

Liste des tableaux xv

Liste des abréviations xix

Glossaire xxi

Introduction Générale 1

1. Etat de l'art 5

1.1. Pseudomonas aeruginosa (PA) 5

1.1.1. Description 5

1.1.2. Les maladies causées par *Pseudomonas aeruginosa* 6

1.1.2.1. Vue générale 6

1.1.2.2. Le cas de la mucoviscidose 6

1.1.3. Biofilm et quorum sensing 7

1.1.3.1. Le biofilm 7

1.1.3.2. Le quorum sensing 9

1.1.4. Les mécanismes de défense de PA dus au biofilm 9

1.1.4.1. Résistance aux antibiotiques 9

1.1.4.2. Echappement au système immunitaire 10

1.1.5. Facteurs de virulence 11

1.1.5.1. Les facteurs de virulence de la matrice extracellulaire du biofilm 11

1.1.5.2. Les facteurs de virulence sécrétés 12

1.1.5.3. Les facteurs de virulence cellulaires 12

1.2. Les lectines de *Pseudomonas aeruginosa* 13

1.2.1. Les lectines du flagelle 14

1.2.1.1. FliC 15

1.2.1.2. FliD 16

1.2.2. Les lectines des *pili* 17

1.2.2.1. PilA et PilY1 : lectines du pili de type IV 17

1.2.2.2. CupB6 19

1.2.3. Les lectines solubles 19
1.2.3.1. PA-IL 20
1.2.3.2. PA-IIL 21
1.3. Nouvelle stratégie de lutte contre les infections à PA 23
1.3.1. Les interactions sucre/lectine 23
1.3.1.1. Notion de thermodynamique 23
1.3.1.2. Notion de constante d'équilibre 25
1.3.2. La multivalence 25
1.3.2.1. Intérêt biologique d'une interaction multivalente 25
1.3.2.2. Les différents mécanismes de multivalence 26
1.3.2.3. La multivalence avec le système lectine/sucre 29
1.3.2.4. Bases thermodynamiques des interactions multivalentes 29
1.3.3. Les différentes structures de glyco-ligands multivalents 33
1.3.3.1. Les glycopolymères 34
1.3.3.2. Les glycodendrimères 34
1.3.3.3. Les glyconanoparticules 36
1.3.3.4. Les glycoclusters 37
1.3.3.5. Les ligands multivalents ciblant les lectines de PA 37
1.4. La caractérisation des interactions protéine/ligand 43
1.4.1. Les méthodes conventionnelles permettant l'analyse d'affinité 44
1.4.1.1. L'inhibition d'hémagglutination (HIA) 44
1.4.1.2. L'Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) 45
1.4.1.3. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR) 46
1.4.1.4. La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) 48
1.4.2. L'outil biopuce au service de l'étude des interactions sucre/lectine 49
1.4.2.1. Définition et application 49
1.4.2.2. La fabrication d'un glycoarray 50
1.4.2.3. Les modes de détection de l'interaction sucre/lectine sur le glycoarray 53
1.4.3. Le glycocluster-microarray développé au laboratoire 54
1.4.3.1. La fabrication du glycocluster-microarray 54
1.4.3.2. Les mesures d'affinité avec le glycocluster-microarray 56

1.4.4. Comprendre les interactions moléculaires entre la lectine et le glycocluster grâce à la modélisation moléculaire 58

1.5. Positionnement de la thèse 59

2. Matériel et méthodes 63

2.1. Bibliothèque de sucres naturels testés 63

2.1.1. Les oligosaccharides issus de la fermentation bactérienne 63

2.1.2. Les oligosaccharides et polysaccharides extraits de la biomasse 66

2.2. Bibliothèque de glycoclusters testés 68

2.2.1. Les glycoclusters ciblant PA-IL 68

2.2.2. Les glycoclusters ciblant PA-IIL 71

2.2.3. Les glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et des *pili* 73

2.3. La fabrication du DDI-microarray 73

2.3.1. La fabrication du support microstructuré 74

2.3.2. Chimie de surface utilisée pour activer le microarray 74

2.3.3. Immobilisation covalente d'un simple brin d'ADN 76

2.3.4. Immobilisation du glycocluster 77

2.3.4.1. Caractérisation AFM de la surface fonctionnalisée avec des glycoclusters 78

2.4. Méthode d'analyse des interactions sonde/cible avec le DDI-microarray 79

2.4.1. Préparation de la lectine 79

2.4.1.1. Marquage de la lectine 79

2.4.1.2. Electrophorèses en conditions natives et dénaturantes 80

2.4.2. Test par compétition pour le criblage de la bibliothèque de sucres 82

2.4.2.1. Choix des glycoclusters de référence 82

2.4.2.2. Criblage de la bibliothèque d'oligosaccharides et polysaccarides 82

2.4.3. Criblage de la bibliothèque de glycoclusters 83

2.4.4. Caractérisation de l'interaction glycocluster/lectine 85

2.4.4.1. Evaluation de l'IC_{50} : analyse semi-quantitative 85

2.4.4.2. Evaluation du K_d : analyse quantitative 86

2.4.5. Lecture de fluorescence 88

2.4.6. Recyclage des microarrays 88

3. Validation de l'outil glycocluster-microarray : Impact de la densité de surface 91

3.1. Contexte bibliographique 91

3.2. Choix des glycoclusters 94
3.3. Caractérisation et modulation de la densité de surface en glycocluster 96
3.3.1. Choix du type de modulation 96
3.3.2. Caractérisation de la surface du glycocluster-microarray par AFM 98
3.3.2.1. Principe de l'AFM 98
3.3.2.2. Topographie et densité d'une surface fonctionnalisée avec des glycoclusters 99
3.4. Impact de la densité de surface en glycocluster sur les mesures d'IC_{50} et de K_d 101
3.4.1. IC_{50} = f(densité de surface) 101
3.4.2. K_d = f(densité de surface) 104
3.5. Conclusion 107
4. Criblage d'une bibliothèque d'oligo- et polysaccharides sur le glycocluster-microarray 109
4.1. Mise en place du test de criblage 109
4.1.1. Description 109
4.1.2. Choix des concentrations de criblage 112
4.1.3. Choix du classement des sucres 113
4.1.3.1. Classement pour le criblage réalisé avec PA-IL 114
4.1.3.2. Classement pour le criblage réalisé avec PA-IIL 116
4.2. Criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IL 117
4.2.1. Vue d'ensemble des résultats 118
4.2.2. Les oligosaccharides produits par fermentation bactérienne 119
4.2.2.1. Les différentes familles d'oligosaccharides reconnues par PA-IL 119
4.2.2.2. Les paramètres influençant l'interaction avec PA-IL 123
4.2.3. Les oligo- et polysaccharides extraits de la biomasse 126
4.2.3.1. Les xyloglucanes 126
4.2.3.2. Les galactomanannes 127
4.2.4. Discussion - conclusion 131
4.3. Criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IIL 133
4.3.1. Vue d'ensemble des résultats 133
4.3.2. Les oligosaccharides produits par fermentation bactérienne 134
4.3.2.1. Les différentes familles d'oligosaccharides reconnues par PA-IIL 135
4.3.2.2. Les paramètres influençant l'interaction avec PA-IIL 138

4.3.3. Les polysaccharides issus de la biomasse 140
4.3.3.1. Les xyloglucanes 140
4.3.3.2. Les mannanes 140
4.3.4. Discussion - conclusion 141
4.4. Conclusion générale 143
5. Etude d'affinité d'une bibliothèque de glycoclusters ciblant les lectines de PA 145
5.1. Etude d'affinité des glycoclusters ciblant PA-IL 146
5.1.1. Glycoclusters présentant différents motifs oligosaccharidiques 147
5.1.1.1. Glycoclusters étudiés 147
5.1.1.2. Etude d'affinité vis-à-vis de PA-IL 149
5.1.2. Galactoclusters présentant différents linkers aromatiques 152
5.1.2.1. Galactoclusters étudiés 154
5.1.2.2. Influence d'un linker présentant différents hétérocycles 158
5.1.2.3. Influence d'un linker présentant différents cycles aromatiques 162
5.1.2.4. Influence de la régioisomérie du cycle : ortho, méta, para 165
5.1.2.5. Influence d'un linker présentant un cycle aromatique et une charge électrostatique 167
5.1.2.6. Modélisation moléculaire de l'interaction multivalente galactocluster/PA-IL 170
5.1.3. Etude des interactions de galactoclusters contenant des atomes de soufre 173
5.1.3.1. Galactoclusters étudiés 173
5.1.3.2. Influence de la liaison phosphorothiate 174
5.1.3.3. Influence de la liaison thio-galactoside 175
5.1.4. Discussion - conclusion 176
5.2. Etude d'affinité des glycoclusters ciblant PA-IIL 178
5.2.1. Etude des interactions de PA-IIL avec des glycoclusters possédant différents motifs saccharidiques et valences 180
5.2.1.1. Glycoclusters étudiés 180
5.2.1.2. Influence du motif saccharidique 181
5.2.2. Etude des interactions de PA-IIL avec des glycocluster possédant différentes topologies 183
5.2.2.1. Glycoclusters étudiés 183
5.2.2.2. Influence de différents cœurs pentoses 183
5.2.2.3. Influence de différents cœurs hexoses 185
5.2.2.4. Comparaison trivalent/tétravalent 186

5.2.3. Effet du linker 1 sur l'interaction glycocluster/PA-IIL 188
5.2.4. Discussion - conclusion 189
5.3. Etude d'affinité des glycoclusters ciblant les lectines des *pili* et du flagelle 191
5.3.1. Glycoclusters étudiés 192
5.3.2. Caractéristiques de production des différentes lectines étudiées 192
5.3.3. Résultats d'affinité sur microarray 195
5.3.3.1. Détection directe de l'affinité grâce aux Alexa647_lectines 195
5.3.3.2. Détection indirecte de l'affinité grâce à des anticorps 198
5.3.4. Conclusion - Perspectives 199
5.4. Conclusion générale 200
Conclusions et perspectives 203
Références bibliographiques 209
Annexes I
Annexe A Structures développées de la bibliothèque de sucres III
A.1. Les sucres produits par fermentation bactérienne III
A.2. Les sucres issus de la biomasse XIII
Annexe B Structures développées des glycoclusters XIX
B.1. Glycoclusters ciblant PA-IL XIX
B.2. Glycoclusters ciblant PA-IIL XXX
B.3. Glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et/ou des *pili* XXXIX
Annexe C Préparation des gels d'électrophorèse et coloration au nitrate d'argent XLI
C.1. Préparation des gels d'électrophorèse XLI
C.2. Coloration au nitrate d'argent XLII
Annexe D Méthode permettant de mesurer un K_d sur microarray XLIII
Annexe E Résultats du criblage de la bibliothèque de sucres XLV
E.1. Sucres positifs au criblage vis-à-vis de PA-IL XLV
E.2. Sucres positifs au criblage PA-IIL L
Annexe F Autres résultats concernant les interactions glycocluster/lectine obtenus sur microarray LIII
F.1. Résultats concernant la lectine PA-IL LIII
F.1.1. Galactoclusters possédant différentes topologies LIII
F.1.2. Galactoclusters linéaires tétravalents avec différents linkers 2 aromatiques LVII

F.1.3. Galactoclusters possédant un hétéroatome de soufre : L1-S-L2 LIX

F.2. Résultats concernant la lectine PA-IIL LXI

F.2.1. Galactoclusters possédant différentes topologies LXI

Liste des publications et communications LXIII

Listes des figures

Figure 1-1 : Représentation schématique d'un glycocluster. 2
Figure 1-2 : Représentation schématique d'un glycocluster-microarray..... 2
Figure 1-1 : Image de microcopie électronique de la bactérie Pseudomonas aeruginosa (source : http://phototheque.pasteur.fr/index2.pgi). 5
Figure 1-2 : Pourcentage de patients atteints de la mucoviscidose et infectés par les bactéries cliniquement importantes en fonction de leur âge en 2013 (http://www.registredelamuco.org, 2013). 7
Figure 1-3 : Représentation schématique du développement du biofilm de Pseudomonas aeruginosa (Høiby et al., 2010). 8
Figure 1-4 : Représentation des différentes lectines présentes chez Pseudomonas aeruginosa (MEC : matrice extracellulaire). 14
Figure 1-5 : Représentation schématique de la structure du flagelle. Adapté de http://www.cbs.dtu.dk/courses/mvnworkshop08/Ex_ProbeDesign/flagella.png. 15
Figure 1-6 : Structure cristallographique du monomère de FliC (réf. PDB : 4NX9) (a) et modélisation de son assemblage en filament (b). Adapté de (Song and Yoon, 2014). 16
Figure 1-7 : Image de microcopie électronique du complexe pentamérique de FliD de Salmonella typhimurium (Ikeda et al., 1996). 17
Figure 1-8 : Représentation schématique de la structure d'un pili de type IV (OM : Membrane externe, CM : Membrane cytoplasmique, NTP : Nucléoside triphosphate) (Bardy et al., 2003). 18
Figure 1-9 : Structure cristallographique de PilA de la souche PAK tronquée pour sa partie hydrophobe N-terminale (réf. PDB : 1DZO) qui a été modélisée (en gris) à partir de la structure de la piline de Neisseria gonorrhoeae (souche MS11) (a) Structure cristallographique du domaine C-terminal de PilY1 (réf. PDB : 3HX6) (b) 19
Figure 1-10 : Structure cristalline de PA-IL (a) et du site de liaison PA-IL/galactose avec les interactions mises en jeu (liaisons hydrogènes en pointillé vert et liaisons de coordination avec le Ca^{2+} en rouge) (b) (réf. PDB : 1OKO). 20
Figure 1-11 : Structure cristalline de PA-IIL (a) et du site de liaison PA-IIL/fucose avec les interactions mises en jeu (liaisons hydrogènes en pointillé vert et liaisons de coordination avec le Ca^{2+} en rouge) (b) (réf. PDB : 1GZT). 21
Figure 1-12 : Les différents mécanismes d'interactions multivalentes intramoléculaires : association par chélation (a), regroupement de récepteurs (b), association au sous-site (c) et réassociation statistique (d). Adapté de (Cecioni et al., 2015). 27
Figure 1-13 : Structure du ligand décavalent « Starfish » (a) et structure cristallographique du sandwich vu de face formé de deux pentamères de la sous-unité B de la toxine Shiga reliés par un ligand « Starfish » (b) et de la moitié du sandwich vu du dessus (c). Adapté de (Kitov et al., 2000). 28
Figure 1-14 : Représentation des changements d'enthalpie pour une interaction multivalente dans le cas d'un ligand multivalent rigide à géométrie parfaitement complémentaire au récepteur (a) et de ligands ayant un linker trop court ou trop long (b). 31
Figure 1-15 : Méthodes de synthèse des glycodendrimères par approche divergente (a) et convergente (b). 35

Figure 1-16 : Structure de glycoclusters à cœur calix[4]arène (a) et à cœur mannose (b) capables de déstabiliser le biofilm de Pseudomonas aeruginosa (Boukerb et al., 2014; Ligeour et al., 2015b). 38
Figure 1-17 : Principe de fonctionnement de la méthode d'inhibition d'hémagglutination (HIA). 45
Figure 1-18 : Représentation schématique de la méthode Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) permettant la mesure d'IC_{50}. 46
Figure 1-19 : Représentation schématique du fonctionnement de la technique résonance plasmonique de surface (SPR) (a) et de la réponse détectée par le détecteur (b). 47
Figure 1-20 : Méthode de microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) avec une représentation schématique du microcalorimètre (a), d'un thermogramme (b) et d'une courbe d'isotherme d'association donnant accès au ΔH, K_a et n de l'association (c). Adapté de http://www.malvern.com. 48
Figure 1-21 : Représentation schématique d'un glycocluster produit par les collaborateurs de l'IBMM de Montpellier. 55
Figure 1-22 : Représentation schématique de l'immobilisation de trois glycoclusters (1, immobilisation covalente avec linker court ; 2, immobilisation covalente avec linker long et 3, immobilisation par DDI) (a) et mesure de leur interaction avec la lectine RCA_{20} pour une concentration d'immobilisation des glycoclusters de 0.5 µM (b) (Zhang et al., 2009a). 55
Figure 1-23 : Principe de fonctionnement du DDI glycocluster-microarray élaboré au laboratoire pour l'étude des interactions glycocluster/lectine. 56
Figure 1-24 : Représentation schématique de la mesure d'IC_{50} et de K_d sur le glycocluster-microarray. 57
Figure 2-1 : Photos du microarray avec le masque de vinyle avant gravure (à gauche) et après gravure (à droite). 74
Figure 2-2 : Représentation schématique de la silanisation, la déprotection et l'activation d'un micropuits de la lame microstructurée. 75
Figure 2-3 : Représentation schématique de l'immobilisation covalente de simples brins d'ADN sur la lame de verre microstructurée. 77
Figure 2-4 : Représentation schématique de l'immobilisation des glycoclusters par hybridation d'ADN à la surface du DDI-microarray. 78
Figure 2-5 : Photo de l'appareillage nécessaire pour réaliser une électrophorèse sur gel (a) et représentation schématique du fonctionnement d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (b). 81
Figure 2-6 : Schéma explicatif du criblage de la bibliothèque de sucres grâce au glycocluster-microarray. 83
Figure 2-7 : Schéma explicatif de la caractérisation de l'interaction glycocluster/lectine par la mesure d'IC_{50} (a) et de K_d (b). 85
Figure 3-1 : Représentation schématique du « surface cluster effect ». 93
Figure 3-2 : Structures des glycoclusters G1 et G2. 94
Figure 3-3 : Moyenne des intensités de fluorescence de Alexa647_PA-IL à 635 nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 95
Figure 3-4 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par le Cy3_glycocluster à 532 nm en fonction de la concentration en glycocluster (Zhang et al., 2009a). 96

Figure 3-5 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par les Cy3_glycoclusters G1 et G2 à 532 nm en fonction de la concentration en ADN spotté sur le microarray. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 640 répétitions. 97
Figure 3-6 : Représentation schématique du principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique (Adapté de http://hosting.umons.ac.be/php/lpsi/fr/microscopie-a-force-atomique) 99
Figure 3-7 : Images AFM de l'immobilisation du glycocluster G2 sur une surface de SiO_2 par DDI en utilisant 25 µM d'ADN immobilisé de façon covalente. La taille des images sont de 2 x 2 μm^2 (a) et de 400 x 400 nm^2 (b) 100
Figure 3-8 : Représentation schématique de la distance entre deux glycoclusters ne permettant pas d'effet cluster de surface. 101
Figure 3-9 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par le Cy3_glycocluster (en vert) et valeurs d'IC_{50} obtenues (en rouge) en fonction de la concentration en ADN spotté pour le glycocluster G1 (a) et le glycocluster G2 (b) 103
Figure 3-10 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par Alexa647_PA-IL en fonction de la concentration en [PA-IL] pour le glycocluster G1 (a) et le glycocluster G2 (b). 105
Figure 3-11 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par le Cy3_glycocluster (en vert) et valeurs de K_d obtenues (en rouge) en fonction de la concentration en ADN spotté pour le glycocluster G1 (a) et le glycocluster G2 (b) 105
Figure 4-1 : Principe du criblage de la bibliothèque de sucres sur le glycocluster-microarray avec l'exemple de quatre sucres présentant soit pas d'affinité pour la lectine, soit une affinité faible, moyenne ou forte pour celle-ci 111
Figure 4-2 : Représentation schématique des courbes IC_{50} obtenues dans le cas où le sucre présente moins (a) ou plus (b) d'affinité que le fucose pour PA-IIL ainsi que les résultats typiquement obtenus dans ces deux cas en fonction des concentrations choisies pour effectuer le criblage (c et d). 113
Figure 4-3 : Potentiel d'inhibition de l'interaction des trois galactoclusters de référence avec PA-IL par deux sucres provenant de l'OligoTech® : l'antigène A (Id.15) et le galactomannane (Id.142). 115
Figure 4-4 : Maximum du pourcentage de l'interaction galactocluster/PA-IL observable pour chacun des groupes A, B, C et D. 115
Figure 4-5 : Potentiel d'inhibition de l'interaction des trois fucoclusters de référence avec PA-IIL par deux sucres provenant de l'OligoTech® : le xyloglucane (Id. 118) et le galactosyl-3Fucosylactose (Gal-3FL, Id. 37). 116
Figure 4-6 : Maximum du pourcentage de l'interaction fucoclusters/PA-IIL observable pour chacun des groupes A, B, C et D (En rayure, % d'interaction similaire entre les notes B, C et D). 117
Figure 4-7 : Diagramme des différentes familles de sucres reconnues par PA-IL avec leur classement associé. 118
Figure 4-8 : Représentation des xyloglucanes avec leur nomenclature associée. Adapté de (Fry et al., 1993). . 127
Figure 4-9 : Représentation des trois galactomannanes polysaccharides présents dans la bibliothèque de sucres, Id.138 (a), Id.139 (b) et Id.140 (c). 127
Figure 4-10 : Potentiels d'inhibition de l'interaction galactocluster de réf. G_{fort} avec PA-IL par les différents oligosaccharides type galactomannane. 129

Figure 4-11 : Cartographie des interactions issue de la modélisation moléculaire de PA-IL avec les disaccharides Galα1-3Gal (a), Galα1-4Gal (b) et Galα1-6Gal (c). 132
Figure 4-12 : Diagramme des différentes familles de sucres reconnues par PA-IIL avec leur classement associé. 134
Figure 5-1 : Représentation schématique d'un glycocluster avec les propriétés attribuées au Cy3-ADN, au cœur, à l'aglycone et au motif saccharidique. 145
Figure 5-2 : Représentation schématique de la lectine PA-IL 146
Figure 5-3 : Représentation schématique des différents cœurs et linkers des molécules étudiées. 149
Figure 5-4 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL à 635 nm pour les molécules et glycoclusters étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 149
Figure 5-5 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL à 635 nm pour les témoins négatifs (TN_1 et TN_2), positif (TP), les galactoclusters G1, G2 et les glycoclusters à motif disaccharide Galα1-3Gal ou Galα1-4Gal. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 152
Figure 5-6 : Modélisation moléculaire de l'interaction des glycosides MeTz- AcNPh-Galα1-3Gal (a) et MeTz-AcNPh-Galα1-4Gal (b) avec PA-IL. 154
Figure 5-7 : Les différentes conformations d'interaction type π-stacking. Adapté de (Meyer et al., 2003). 157
Figure 5-8 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 159
Figure 5-9 : Modélisation moléculaire de l'interaction des galactosides EG_2NOC**Thioph**M-Gal (a), EG_2NOC**Fur**M-Gal (b), EG_2NOC^3**Bn**-Gal (c) et EG_2NOC^3**Pyr**M-Gal (d) avec PA-IL. 161
Figure 5-10 : Modélisation moléculaire de l'interaction des galactosides **Bn**-Gal (a), **Ph**-Gal (b), **BiPh**-Gal (c) et **Napth**-Gal (d) avec PA-IL. 164
Figure 5-11 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. 166
Figure 5-12 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. 168
Figure 5-13 : Modélisation moléculaire de l'interaction des galactosides AcTyr-Gal(**COO$^-$**) (a) et EG_2NTyr-Gal(**NH_3^+**) (b) avec PA-IL. 170
Figure 5-14 : Représentation du cœur mannose avec la position sur laquelle les bras galactosides sont greffés. 171
Figure 5-15 : Modélisation moléculaire de l'interaction du galactocluster Man(EG_2MTzAcTyr(COO^-)-Gal)$_4$ avec PA-IL. 173
Figure 5-16 : Représentation schématique des galactoclusters possédant un ou deux hétéroatomes de soufre. . 174
Figure 5-17 : Représentation schématique de PA-IIL. 179
Figure 5-18 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les molécules monovalentes et les glycoclusters étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 181
Figure 5-19 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur pentose étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 184
Figure 5-20 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur hexose étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 186
Figure 5-21 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur xylose et galactose étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 187

Figure 5-22 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur xylose et galactose étudiés variant pour le linker 1(EG_2 ou EG_4). Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. 188
Figure 5-23 : Moyenne des intensités de fluorescence à 635nm corrigée par le signal du bruit de fond ($F\text{-}B_{635}$) pour les lectines PilA et FliD à 0.5 µM et 2.5µM pour chacun des glycoclusters testés. 195
Figure 5-24 : Gels d'électrophorèse (15 % et 8 % d'acrylamide, pour PilA et FliD respectivement) obtenus en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et natives (PAGE). Pour chacune des conditions, une photo des gels est prise après coloration au nitrate d'argent (haut) et sous excitation à 635 nm afin de détecter l'Alexa647 (bas). 197
Figure 5-25 : Représentation schématique de la détection indirecte de l'interaction lectine/glycocluster grâce à l'utilisation d'anticorps. 199
Figure 5-26 : Quantification par fluorescence du biofilm de Pseudomonas aeruginosa PAO1 en présence d'une concentration croissante de Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$ (a) et images de microscopie confocale d'un biofilm de 24 h de la souche sauvage PAO1 avec ou sans galactocluster et du mutant de PA-IL (ΔLecA) (b). Adapté de (Ligeour et al., 2015b). 201
Figure E-1 : Histogrammes représentant le potentiel d'inhibition de l'interaction galactoclusters de référence G_{moyen} (bleu) et G_{fort} (noir) avec PA-IL par les sucres de la bibliothèque dont le criblage avait montré une affinité vis-à-vis de PA-IL. XLVII
Figure E-2 : Histogrammes représentant le potentiel d'inhibition de l'interaction fucocluster de référence G_{moyen} avec PA-IIL par les sucres de la bibliothèque dont le criblage avait montré une affinité vis-à-vis de PA-IIL. L
Figure F-1 : Représentation schématique des différentes topologies étudiées : linéaire en peigne (a), linéaire alternée (b), centrée de valence 4 (c) et centrée de valence 3 (d). LIV
Figure F-2 : Constante de dissociation des différents galactoclusters étudiés ici. Les barres d'erreur représentent une erreur de 10 %. LVI
Figure F-3 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. LVIII
Figure F-4 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions. LX
Figure F-5 : Modélisation des interactions des galactosides EG_2**Tz**AcNPh-Gal (a) et EG_2**S**AcNPh-Gal (b) avec les résidus His50 et Pro51 de PA-IL. LXI
Figure F-6 : Constante de dissociation des différents fucoclusters étudiés ici. Les barres d'erreur représentent une erreur de 10 %. LXII

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Rôles et ligands putatifs ou avérés des sept lectines de Pseudomonas aeruginosa étudiées. 22
Tableau 1-2 : Principaux ligands multivalents ciblant PA-IL classés par famille et caractérisés par leur constante de dissociation déterminée par ITC. Le facteur d'amélioration β (cf. 1.3.2.4) décrit l'amélioration d'affinité par rapport au galactose. 39
Tableau 1-3 : Principaux ligands multivalents ciblant PA-IIL classés par famille et caractérisés par leur K_d déterminée par ITC ou leur IC_{50} déterminée par ELLA. Le facteur d'amélioration β (cf. 1.3.2.4) décrit l'amélioration d'affinité par rapport au fucose. 40
Tableau 1-4 : Principales méthodes de greffage de ligands sur un glycoarray avec leurs avantages et inconvénients. 52
Tableau 1-5 : Les différentes caractéristiques des méthodes de détection de l'interaction sucre/lectine 54
Tableau 2-1 : Liste des oligosaccharides produits par fermentation bactérienne. 66
Tableau 2-2 : Liste des oligosaccharides et polysaccharides issus de la biomasse. 68
Tableau 2-3 : Liste des glycoclusters ciblant PA-IL. 71
Tableau 2-4 : Liste des glycoclusters ciblant PA-IIL. 73
Tableau 2-5 : Liste des glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et/ou des pili. 73
Tableau 2-6 : Séquences ADN utilisées pour ces travaux de thèse avec leur % GC et leur température de fusion Tm. 76
Tableau 2-7 : Glycoclusters de référence choisis pour le criblage vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL. 82
Tableau 2-8 : Gradient de concentration en compétiteur utilisé pour réaliser un IC_{50}. 86
Tableau 2-9 : Gradient de concentration en lectine utilisé pour réaliser un K_d. 87
Tableau 3-1 : Courbes d'IC_{50} obtenues pour les glycoclusters G1 et G2 et chaque densité de surface relative en glycoclusters avec le logiciel « BioDataFit 1.02 ». 102
Tableau 4-1 : Valeurs d'IC_{50} des différents glycoclusters de référence utilisés pour le criblage des 156 sucres vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL. 112
Tableau 4-2 : Effet du résidu à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IL. 119
Tableau 4-3 : Les oligosaccharides de la famille « Core Structure » reconnus par PA-IL. 120
Tableau 4-4 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des groupes sanguins du système ABO reconnus par PA-IL. 121
Tableau 4-5 : Les oligosaccharides de la famille des sucres type globoside (antigène P) reconnus par PA-IL. 122
Tableau 4-6 : Les oligosaccharides de la famille des sucres à motif « Galα1-3Gal » reconnus par PA-IL. 122
Tableau 4-7 : Les oligosaccharides type disaccharides, galactosyl-lactose et $Lewis^X$ reconnus par PA-IL. 123
Tableau 4-8 : Influence de la liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IL. 124
Tableau 4-9 : Influence de la ramification de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IL. 125
Tableau 4-10 : Influence de la longueur de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IL 126
Tableau 4-11 : Représentation des différentes structures de galactomannanes oligosaccharides avec leur degré de polymérisation (DP) associé. 128
Tableau 4-12 : Oligosaccharides sélectionnés pour la synthèse de glycoclusters. 133

Tableau 4-13 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des groupes sanguins du système ABO reconnus par PA-IIL. 135
Tableau 4-14 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des groupes sanguins du système Lewis reconnus par PA-IIL. 136
Tableau 4-15 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des oligosaccharides fucosylés reconnus par PA-IIL. 137
Tableau 4-16 : Les oligosaccharides Fuc-GM1, DiFucosyl-pentaose et de type globo-H (GbH) reconnus par PA-IIL. 137
Tableau 4-17 : Influence de la liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IIL. 138
Tableau 4-18 : Influence du nombre de résidus fucoses possédant le même type de liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IIL. 139
Tableau 4-19 : Influence du nombre de résidus fucoses possédant différents types de liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IIL. 139
Tableau 4-20 : Influence de la longueur de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IIL. 140
Tableau 4-21 : Oligosaccharides sélectionnés pour la synthèse de glycoclusters. 143
Tableau 5-1 : Liste des oligosaccharides sélectionnés à la suite du criblage vis-à-vis de PA-IL 147
Tableau 5-2 : Glycoclusters et molécules monovalentes étudiés. 148
Tableau 5-3 : Structure des différents glycosides MeTz-Linker2-Galα1-3/4Gal associée à leur énergie potentielle d'interaction (ΔE) avec PA-IL obtenue par modélisation moléculaire. 153
Tableau 5-4 : Représentation des différents linkers (L1 et L2) avec leurs propriétés respectives. Sur la gauche, le linker 1 est relié au cœur mannose, sur la droite le linker 2 est relié au galactose. Les chiffres en exposant indiquent la régioisomérie du cycle : 2 = ortho, 3 = méta, Ø = para. 156
Tableau 5-5 : Galactoclusters étudiés possédant trois linker 1 aliphatiques différents et quatre linker 2 aromatiques différents. Le chiffre 3 en exposant indique la régioisomérie méta du cycle. 158
Tableau 5-6 : Energies potentielles d'interaction des différents galactosides avec la contribution des résidus His50 et Pro38 de PA-IL. 160
Tableau 5-7 : Galactoclusters étudiés avec leurs valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues sur le microarray. 162
Tableau 5-8 : Energies potentielles d'interaction des différents galactosides avec la contribution des résidus His50, Pro51 et Pro38 de PA-IL. 163
Tableau 5-9 : Galactoclusters étudiés. Les chiffres en exposant indique la régioisomérie du cycle : 2 = ortho, 3 = méta, Ø = para. 165
Tableau 5-10 : Galactoclusters étudiés. 167
Tableau 5-11 : Energies potentielles d'interaction des différents galactosides avec PA-IL. 169
Tableau 5-12 : Energies potentielles d'interaction de différents galactoclusters dont deux bras interagissent avec un tétramère de PA-IL. 171
Tableau 5-13 : Galactoclusters étudiés avec leurs valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues sur le microarray. 174
Tableau 5-14 : Galactoclusters étudiés avec leurs valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues sur le microarray. 175
Tableau 5-15 : Liste des oligosaccharides sélectionnés à la suite du criblage vis-à-vis de PA-IIL. 179
Tableau 5-16 : Glycoclusters et molécules monovalentes étudiés. 180
Tableau 5-17 : Représentation des différents cœurs pentoses et hexoses. 183

Tableau 5-18 : Glycoclusters à cœur pentose étudiés. 184
Tableau 5-19 : Glycoclusters à cœur hexose étudiés 185
Tableau 5-20 : Ligands potentiels des différentes lectines des pili et du flagelle de Pseudomonas aeruginosa.. 191
Tableau 5-21 : Liste des glycoclusters étudiés pour chacune des lectines avec pour chacun d'entre eux la lectine ciblée. Les motifs saccharidiques sont rattachés par leur extrémité réductrice (à droite) au bras du galactocluster. 192
Tableau 5-22 : Description des différentes lectines produites en hétérologue. 193
Tableau A-1 : Structures développées des sucres produits par fermentation bactérienne. XIII
Tableau A-2 : Structures développées des sucres issus de la biomasse. XVIII
Tableau B-1 : Structures développées des glycoclusters ciblant PA-IL. XXIX
Tableau B-2 : Structures développées des glycoclusters ciblant PA-IIL XXXIX
Tableau B-3 : Structures développées des glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et/ou des pili de PA. XXXIX
Tableau C-1 : Composition des gels d'électrophorèse avec le volume nécessaire pour faire deux gels à 8 et à 15 % d'acrylamide. Les produits sont ajoutés dans l'ordre d'apparition dans le tableau et le SDS est rajouté seulement pour les électrophorèses en conditions dénaturantes. XLI
Tableau E-1 : Tableau récapitulatif de tous les sucres de la bibliothèque dont le criblage a révélé une interaction avec PA-IL. XLIX
Tableau E-2 : Tableau récapitulatif de tous les sucres de la bibliothèque dont le criblage a révélé une interaction avec PA-IIL. LII
Tableau F-1 : Galactoclusters étudiés. LV
Tableau F-2 : Galactoclusters étudiés. LVII
Tableau F-3 : Galactoclusters étudiés. LIX
Tableau F-4 : Galactoclusters étudiés. LXI

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFM : Microscopie à force atomique
Ara : Arabinose
BiPh : Biphényle
Bn : Benzyle
BSA : Sérum d'albumine bovin
Cy3 : Cyanine 3
CRD : Domaine de reconnaissance des carbohydrates
DDI : Immobilisation par hybridation d'ADN (DNA directed immibibilization)
DMCH : 1,4-Dimethylcyclohexane
DP : Degré de polymérisation
$EG_{2/3/4}$: Di/Tri/Tétra éthylène glycol
ELLA : Enzyme-Linked Lectin Assay
Et : Ethyle
Fuc : Fucose
Fur : Furane
Gal : Galactose
GalMan : galactomannane
Glc : Glucose
Hex : Hexyle
HIA : Inhibition d'hémagglutination
HisX : Histidine n°X
IC_{50} : Concentration d'inhibition à 50 %
ITC : Microcalorimétrie de titration isotherme
K_d : Constante de dissociation
Le : Lewis
LNnT : Lacto-*N*-neotetraose
Man : Mannose
NAc : *N*-Acétyle
Napht : Naphtyle
NHS : *N*-hydroxysuccinimide
PA : *Pseudomonas aeruginosa*
PBS : Tampon phosphate salin
Ph : Phényle
pI : Point isoélectrique
PMT : Photomultiplicateur
Pro : Propyle
ProX : Proline n°X
Pyr : Pyridine
QS : Quorum sensing
Ribo : Ribose
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SPR : Résonance plasmonique de surface
SSC : Citrate de sodiul salin
THF : Tétrahydrofurane
ThioPh : Thiophène
THME : 1,1,1-(trishydroxyméthyl)éthane
TN : Témoin négatif
TP : Témoin positif
Tyr : Tyrosine
Tz : Triazole
u.a. : unité arbitraire
Xylo : xylose
3FL : 3-Fucosyllactose
4/6GrB : Groupe sanguin B tetra/hexaose

Glossaire

Aglycone : Groupement non glucidique du glycocluster.

Biofilm : Communauté mono ou polymicrobienne qui se forme sur une surface où elle acquière une structure tridimentionnelle.

Champ de force : Ensemble d'équations et de paramètres permettant de calculer l'énergie potentielle d'interaction d'un complexe sonde/cible par modélisation moléculaire.

Cible : Molécule à détecter dans un milieu liquide.

Cœur : Plateforme sur laquelle sont branchés les bras du glycocluster.

DDI : Méthode permattant d'immobiliser des sondes (glycolcusters) sur une surface par hybridation d'ADN.

Effet chélate : Augmentation d'affinité grâce à l'interaction d'un ligand multivalent avec un récepteur multivalent. Aussi appelé « cluster glycoside effect » pour le système sucre/lectine.

Glycocluster : Molécules synthètiques présentant de façon muiltivalente des sucres et ne possédant pas de motifs de répétition. Ils sont construits à partir d'un cœur sur lequel sont branchés des bras se terminant par un sucre.

IC_{50} : Concentration en compétiteur permettant d'inhiber de 50 % l'interaction maximale du complexe sonde/cible.

K_d : Constante de dissociation traduisant à l'équilibre et dans notre cas la concentration de cible (lectine) nécessaire pour avoir 50 % des sondes (glycocusters) liés à la cible. Il s'agit d'un K_d de surface.

Lectine : Protéine qui reconnait de façon spécifique et non covalente des sucres sans les modifier. Il peut s'agir d'adhésines quand elles sont impliquées dans un processus d'adhésion.

Linker : Bras du glycocluster permettant d'éloigner le sucre du coeur

Microarray : Lame de verre microstructurée et fonctionnalisée avec des glycolcusters immobilisés par DDI.

Sonde : Molécule immobilisée à la surface du microarray.

Spotter : Robot permettant le dépôt de gouttes de sonde (300 pL) par une aiguille métallique et un système piezoélectrique avec une précision de 5 µm et à la cadence d'environ 5000 spots à l'heure.

Introduction Générale

Pseudomonas aeruginosa (PA) est une bactérie opportuniste qui provoque essentiellement des infections pulmonaires aiguës ou chroniques chez des personnes vulnérables ou immunodéprimées. Elle est, en France, le troisième germe impliqué dans les maladies nosocomiales après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et la principale cause de mortalité chez les patients atteints de la mucoviscidose. C'est une bactérie ubiquitaire qui est capable de former des biofilms sur des surfaces où les bactéries vivent en communauté et sont engluées dans une matrice polymérique protectrice. Le biofilm peut être associé à l'image d'un château fort dans lequel les bactéries sont protégées des attaques extérieures comme celles du système immunitaire. De part sa grande adaptabilité métabolique et sa capacité à former des biofilms, PA est devenue résistante à la plus part des antibiothérapies. Trouver de nouveaux traitements pour combattre *Pseudomonas aeruginosa* est donc un enjeu majeur de santé publique.

Pour exercer sa pathogénicité, PA possède un arsenal de facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, des lectines sont impliquées dans son adhésion aux tissus de l'hôte et dans la formation du biofilm. Les lectines sont des protéines capables de reconnaitre de manière spécifique et réversible des motifs saccharidiques comme notamment ceux présents sur les mucines de l'appareil respiratoire. Une stratégie émergente pour combattre *Pseudomonas aeruginosa*, est donc de trouver des leurres moléculaires présentant des motifs saccharidiques qui auraient plus d'affinité pour les lectines que leurs ligands naturels. L'idée est d'empêcher ou tout du moins perturber, le processus infectieux de PA dans l'espoir de rendre ce pathogène plus vulnérable et sensible aux traitements antibiotiques et d'éviter les infections chroniques.

Les travaux de cette thèse s'articulent donc autour de la recherche de leurres moléculaires ayant une forte affinité pour les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*. Les lectines ciblées sont celles présentent sur le flagelle (FliC, FliD) et les *pili* (PilA, PilY1, CupB6) de PA ainsi que deux lectines solubles (PA-IL, PA-IIL). Les leurres moléculaires sont soit des oligo- et

polysaccharides issus du monde du vivant soit des molécules multivalentes synthétiques présentant plusieurs motifs saccharidiques (glycoclusters) (Figure 1-1).

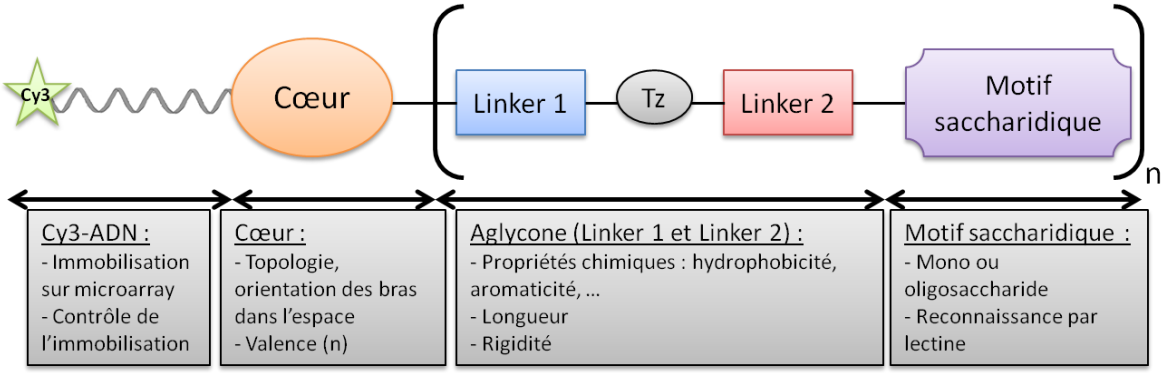


Figure 1-1 : Représentation schématique d'un glycocluster.

Trouver le meilleur leurre moléculaire suppose une étude fine de leur interaction avec les lectines ciblées. Pour cela, nous avons développé un glycocluster-microarray basé sur la technologie des « puces à ADN 3D ». Ce glycocluster-microarray est une plateforme microstructurée sur laquelle les glycoclusters sont immobilisés par hybridation d'ADN (DNA Directed Immobilization, DDI) (Figure 1-2). Cet outil permet :

- l'utilisation d'une faible quantité de matériel (quelques dizaines de picomoles),
- l'utilisation de différentes conditions expérimentales,
- une analyse simultanée d'une grande diversité de leurres moléculaires,
- une analyse qualitative à quantitative des interactions (Fluorescence, IC_{50} et K_d).

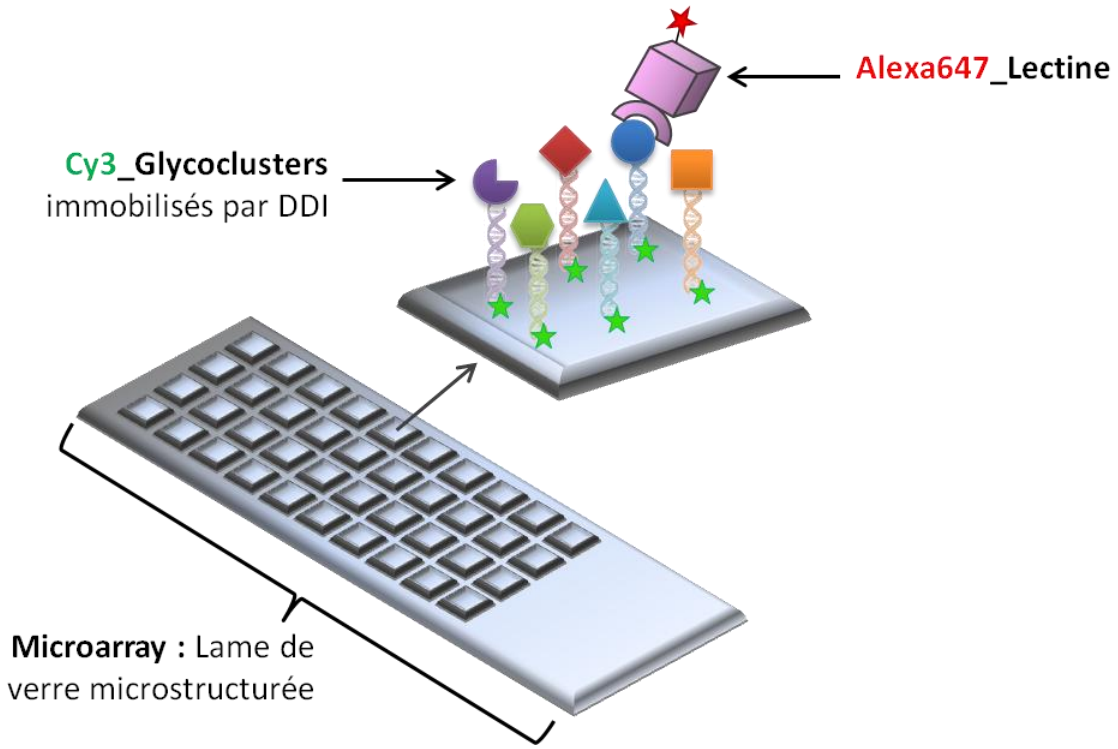


Figure 1-2 : Représentation schématique d'un glycocluster-microarray.

Le premier volet de cette thèse a été de valider l'outil glycocluster-microarray pour la mesure d'affinité (IC_{50} et de K_d) entre des glycoclusters et une lectine. Pour cela, l'impact de la densité de surface en glycocluster a été étudié en modulant la quantité d'ADN immobilisé de façon covalente sur le microarray et en contrôlant l'immobilisation des Cy3_glycoclusters par une mesure de fluorescence. Puis, nous nous sommes intéressés à la recherche de motifs saccharidiques permettant une forte interaction avec les lectines de PA. Pour cela, il a été développé une méthode originale de criblage par compétition d'une bibliothèque d'oligo- et polysaccharides sur le glycocluster-microarray. De ce criblage ont été sélectionnés les meilleurs motifs sacchridiques. Ils ont ensuite été utilisés pour synthétiser une bibliothèque de glycoclusters présentant différentes topologies, valences et propriétés. Cette bibliothèque a de nouveau été criblée sur le microarray et l'affinité des meilleurs candidats a été caractérisée par des mesures d'IC_{50} et de K_d. En support des résultats expérimentaux obtenus sur le microarray, les outils de la modélisation moléculaire ont été utilisés pour comprendre les interactions mises en jeu lors de la reconnaissance du leurre moléculaire avec la lectine ciblée.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un contexte pluridisciplinaire. Les glycosides (motifs saccharidiques) ont été synthétisés chimiquement par l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS, université de Lyon) ou produits à partir du monde du vivant par la société ELICITYL (Crolles). Les glycoclusters ont été synthétisés par l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, université de Montpellier) et les lectines ont été fournies par la société ELICITYL et l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, Université de Lille). Nous avons ensuite testé ces structures sur microarray à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL). Enfin, les tests *in vitro* et *in vivo* ainsi que la modélisation moléculaire ont été réalisés à l'UGSF.

Chapitre 1

Etat de l’art

1. Etat de l'art

1.1. *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

1.1.1. Description

Pseudomonas aeruginosa (PA) appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. C'est une bactérie à Gram négatif qui forme de fins bâtonnets d'environ 1.5 µm de long et 0.5-1.0 µm de large. Elle possède un flagelle polaire et des *pili* lui permettant de se déplacer et d'adhérer aux surfaces (Figure 1-1). PA est une bactérie ubiquitaire, elle est capable de se développer dans de nombreuses niches écologiques que ce soit en environnement aquatique ou terrestre, sur les plantes ou les animaux. Par ce fait, elle fait preuve d'une grande adaptabilité métabolique pouvant utiliser aussi bien des petites molécules que des composés organiques complexes comme source de carbone et d'énergie.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste ce qui signifie qu'elle est inoffensive pour les individus sains mais qu'elle cause des infections aiguës ou chroniques chez les individus immunodéprimés ou chez les patients plus susceptibles de développer une infection (grands brulés, diabétiques,…). Chez l'individu sain, PA est généralement présente sur la peau, dans l'appareil respiratoire supérieur et/ou dans l'oreille externe à l'état commensal (Rehm, 2008).

Figure 1-1 : Image de microcopie électronique de la bactérie Pseudomonas aeruginosa (source : *http://phototheque.pasteur.fr/index2.pgi).*

1.1.2. Les maladies causées par *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.2.1. Vue générale

Chez l'homme, PA est à l'origine de différents types d'infections qu'elles soient aiguës ou chroniques. Elle peut notamment causer des infections oculaires comme une inflammation de la cornée, des infections cutanées suite à une blessure ou une brûlure et des infections auriculaires externes conduisant à des otites chroniques.

De plus, PA est responsable d'infections urinaires et de nombreuses affections de l'appareil respiratoire. Ces dernières sont souvent contractées en milieu hospitalier suite à une intervention chirurgicale, une intubation ou l'utilisation de matériel médical (cathéters, sondes,…) : ce sont des infections dites nosocomiales. En 2012 et en France, PA est le troisième pathogène impliqué dans les maladies nosocomiales (10%) après *Escherichia coli* (26%) et *Staphylococcus aureus* (16%) d'après l'enquête nationale de prévalence des maladies nosocomiales.

1.1.2.2. Le cas de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive assez fréquente qui touche environ 200 nouveaux nés par an en France. La maladie est transmise par le père et la mère portant chacun une version mutée du gène responsable de la mucoviscidose. Cette maladie atteint principalement les voies respiratoires et digestives. Elle consiste en une viscosité anormale du mucus qui s'accumule dans ces organes.

Le gène impliqué dans la mucoviscidose a été identifié en 1989 sur le bras long du chromosome 7, il code pour une protéine appelée régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR) (Kerem et al., 1989). Cette protéine régule le flux d'ions chlorures à travers la membrane des cellules épithéliales, notamment dans les tissus pulmonaires et digestifs. De nombreuses mutations de ce gène ont pu être identifiées conduisant toutes à une protéine CFTR non fonctionnelle, ce qui entraine un disfonctionnement dans le transport du chlore à travers les membranes. Au niveau pulmonaire et digestif, CFTR mutée entraine une accumulation de chlore dans la cellule ce qui modifie le gradient osmotique et diminue la sortie passive d'eau. Ceci provoque une déshydratation des sécrétions et donc un mucus plus épais et visqueux. A l'inverse, au niveau des glandes sudoripares, l'orientation du flux du transport du chlore est inversée, provoquant une teneur élevée en chlore dans la sueur des malades. Cette observation clinique a donné lieu à un test diagnostic de la maladie appelé « test de la sueur » qui peut aujourd'hui être complété par un

test génétique. Au niveau pulmonaire, l'épaississement du mucus entraine une défaillance de la clairance muco-ciliaire, les poussières et agents infectieux sont moins bien éliminés favorisant ainsi la mise en place d'infections chroniques des voies respiratoires. Parmi les germes retrouvés chez les malades atteints de la mucoviscidose, *Pseudomonas aeruginosa* est le plus fréquent et est malheureusement la principale cause de mortalité (Gibson et al., 2003) (Figure 1-2).

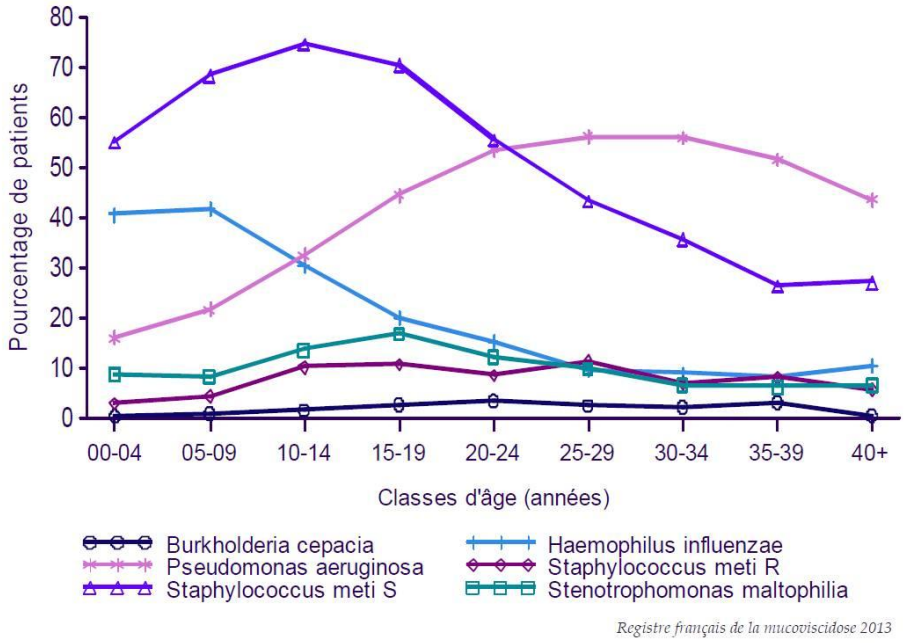


Figure 1-2 : Pourcentage de patients atteints de la mucoviscidose et infectés par les bactéries cliniquement importantes en fonction de leur âge en 2013 (http://www.registredelamuco.org, 2013).

Que ce soit chez les patients atteints de maladies nosocomiales, de mucoviscidose ou de patients immunodéprimés, *Pseudomonas aeruginosa* est responsable d'infections aiguës et chroniques graves pouvant entrainer la mort. De plus, de part sa grande adaptabilité métabolique et sa capacité à se développer en biofilm, PA a développé de nombreuses résistances aux antibiothérapies. C'est pourquoi, ce germe est devenu une source de préoccupation majeure dans le domaine médical.

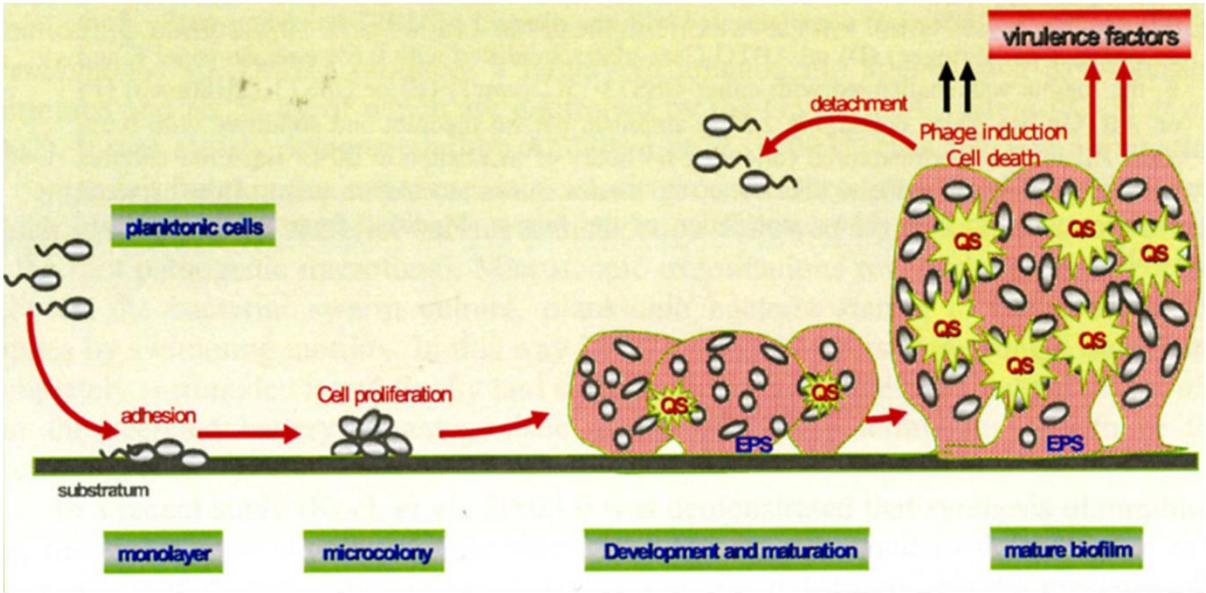
1.1.3. Biofilm et quorum sensing

1.1.3.1. Le biofilm

Le biofilm est une communauté mono ou polymicrobienne qui se forme sur une surface où elle acquière une structure tridimensionnelle. L'un des principaux rôles du biofilm est d'apporter un avantage sélectif aux bactéries, par rapport à leur état libre, en les protégeant des défenses immunitaires de l'hôte ou encore des traitements antibiotiques. Cette structure,

biofilm, est associée à la formation, par les microorganismes, d'une matrice extracellulaire qui est constituée de polymères complexes « Extracellular Polymeric Substance » ou EPS. Les biofilms sont ubiquitaires c'est-à-dire qu'ils peuvent se développer sur des substrats d'origine végétale, minérale, aquatique ou abiotique. Le biofilm peut, par exemple, aussi bien se former sur les dents, c'est ce que l'on appelle la plaque dentaire, que sur du matériel médical comme les cathéters. C'est une structure qui est vivante, dynamique et en perpétuel remaniement.

Le biofilm se forme en plusieurs étapes. Il est initié par des bactéries planctoniques (libres de bouger dans le milieu) qui sont capables de s'attacher de façon réversible sur une surface grâce à la présence de macromolécules formant un film de conditionnement. Il s'en suit une adhésion irréversible des bactéries avec une prolifération cellulaire pour former des microcolonies qui commencent à produire une matrice polymérique. Puis, le biofilm se développe, les bactéries ont alors un fort taux de croissance et augmentent leur activité métabolique, jusqu'à former un biofilm mature. Le quorum sensing (QS), qui sera défini dans le prochain paragraphe, joue un rôle important dans le développement de ce biofilm. Par exemple, le QS régule l'expression de gènes contrôlant la production de la matrice (Sakuragi and Kolter, 2007). Enfin, du biofilm mature, des bactéries peuvent se détacher pour aller coloniser de nouvelles surfaces et des facteurs de virulence sont émis de celui-ci. (Høiby et al., 2010)(Stoodley et al., 2002) (Figure 1-3).



QS : Quorum Sensing ; EPS : Matrice polymérique extracellulaire hydratée

Figure 1-3 : Représentation schématique du développement du biofilm de Pseudomonas aeruginosa (Høiby et al., 2010).

1.1.3.2. Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées « autoinducteurs » générées pendant la phase de croissance bactérienne. Lors de l'établissement d'un biofilm, les bactéries se retrouvent en communauté dense et utilisent alors le quorum sensing pour communiquer et induire l'expression de certains gènes dans le but, notamment, de résister aux traitements antibiotiques.

Chez les bactéries à Gram négatif, le premier mécanisme de QS a été découvert chez *Vibrio Fischeri,* c'est le système LuxI/LuxR qui est responsable de la bioluminescence. Chez PA, ce même type de mécanisme de QS est décrit à travers les systèmes LasI/LasR et RhlI/RhlR. Un troisième système de QS est aussi décrit chez PA correspondant au *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). Ces systèmes de QS sont interconnectés et régulent environ 10 % du génome de PA dont les gènes permettant l'établissement du biofilm et la synthèse de facteurs de virulence. Il a notamment été montré que le régulon Rhl permettait l'expression des gènes *LecA* et *LecB* codant respectivement pour les facteurs de virulences PA-IL et PA-IIL (Winzer et al., 2000). Il régule également la production de rhamnolipides permettant l'établissement de canaux essentiels à la structuration du biofilm (Davey et al., 2003). De plus, une étude menée en 2002 a aussi montré qu'un mutant de PA Δ*LasI*/*RhlI* ayant un déficit en production d'autoinducteurs présentait une virulence atténuée dans un modèle de pneumonie chez la souris (Smith et al., 2002).

Le QS et la formation du biofilm sont donc en étroite relation et permettent à PA d'avoir une grande adaptabilité et d'exercer sa virulence.

1.1.4. Les mécanismes de défense de PA dus au biofilm

1.1.4.1. Résistance aux antibiotiques

La mise en place d'un biofilm confère aux bactéries un avantage sélectif. Les bactéries présentes dans un biofilm sont 100 à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que la même souche planctonique (Høiby et al., 2010). Les propriétés physico-chimiques, mécaniques et biochimiques du biofilm induiraient une limitation du transport des antibiotiques au sein de celui-ci. Cependant, la matrice du biofilm ne semble pas pouvoir être une barrière physico-chimique étanche aux antibiotiques car certaines études menées sur différents types de biofilms et différents antibiotiques ont montré que certains antibiotiques pouvaient diffuser dans le biofilm (Vrany et al., 1997) (Jefferson et al., 2005). Néanmoins, leur diffusion à

travers le biofilm peut être retardée laissant le temps aux bactéries d'exprimer leurs mécanismes inductibles de résistance comme l'expression d'une enzyme appelée β-lactamase. Cette enzyme est capable de détruire les antibiotiques de la famille des β-lactames qui ont pour fonction d'inhiber la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries pour entrainer leur mort (Bagge et al., 2004). La présence d'alginate dans le biofilm de PA permet aussi d'inactiver les antibiotiques de la famille des aminosides qui sont des antibiotiques perturbant la traduction des ARNs messagers en protéines. L'alginate chargé négativement permet de piéger les aminosides chargés positivement et d'empêcher leur action (Walters et al., 2003). De même, la matrice du biofilm est également composée d'ADN aussi capable d'interagir avec les aminosides (Chiang et al., 2013). De plus, les bactéries se trouvent dans différents stades métaboliques lorsqu'elles sont dans un biofilm. Le biofilm est stratifié et les bactéries au centre de celui-ci ont un accès limité aux nutriments et à l'oxygène, elles ont ainsi un métabolisme ralenti avec peu ou pas de croissance. Les antibiotiques actifs en phase de croissance bactérienne comme les β-lactames ne sont donc d'aucune efficacité sur les bactéries présentes au centre du biofilm.

1.1.4.2. Echappement au système immunitaire

Le système immunitaire est l'ensemble des processus biologiques permettant à l'individu de se défendre contre les agressions physico-chimiques après une blessure ou une brûlure mais aussi contre les agressions causées par des micro-organismes comme les infections bactériennes. Des études montrent que PA est capable de détourner le système immunitaire de l'hôte pour s'en protéger et l'attaquer. En effet, PA est capable de se protéger de la phagocytose effectuée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, on parle du phénomène de « phagocytose frustrée ». La phagocytose est un processus du système immunitaire consistant en l'encapsulation des microorganismes par les macrophages ou les polynucléaires neutrophiles de l'hôte, qui ensuite délivrent des substances toxiques en vue de détruire le pathogène. Dans le cas de biofilms formés par PA, le processus de phagocytose induit par l'hôte est perturbé par les composants de la matrice du biofilm. Il a été montré que l'alginate était impliqué dans cette « phagocytose frustrée » (Leid et al., 2005). Outre la non élimination du pathogène, une des conséquences de cette phagocytose frustrée est que les macrophages vont libérer leur contenu toxique (comme des radicaux libres d'oxygène) dans le milieu. Ceci va donc détruire les tissus sains de l'hôte et maintenir l'inflammation, ce qui sera propice à l'installation chronique de l'infection. D'autres composants du système immunitaire sont aussi invoqués dans cet échappement, comme le complément qui est inactivé par la

production par PA d'une protéase alkaline pendant sa phase de croissance active (Jensen et al., 2010).

Enfin, des travaux montrent que PA surexprime un grand nombre de facteurs de virulence lors des différentes phases de maturation du biofilm afin de s'adapter et de résister aux systèmes de défense de l'hôte et aux agressions de l'environnement (Balasubramanian et al., 2011; Bjarnsholt et al., 2005).

1.1.5. Facteurs de virulence

Le QS et l'établissement du biofilm sont à l'origine de la production d'un arsenal de facteurs de virulence (Gellatly and Hancock, 2013). Les facteurs de virulence sont des molécules produites par une bactérie et qui exacerbent sa pathogénicité. Ils lui permettent d'échapper au système de défense de l'hôte afin de l'envahir, de le coloniser et de lui nuire. Certains de ces facteurs de virulence sont les constituants de la matrice du biofilm et les composants présents chez PA. Il sera exposé, ici, les principaux facteurs de virulence de PA ainsi que leurs rôles. Ceux-ci ont été classés dans ce qui suit selon leur localisation plutôt que selon leur fonction (facteur d'invasion, d'adhésion, ...).

1.1.5.1. Les facteurs de virulence de la matrice extracellulaire du biofilm

La matrice extracellulaire du biofilm de PA est essentiellement composée de trois exopolysaccharides dont l'alginate (Franklin et al., 2011; Ryder et al., 2007). Outre leur rôles dans la formation du biofilm, les alginates sont responsables de la résistance aux antibiotiques (cf. 1.1.4.1) et de l'échappement au système immunitaire (cf. 1.1.4.2) (Leid et al., 2005; Walters et al., 2003). De l'ADN extracellulaire également présent dans la matrice du biofilm de PA permet de connecter les cellules bactériennes entre elles pour structurer le biofilm et piéger certaines familles antibiotiques (cf. 1.1.4.1) (Chiang et al., 2013; Yang et al., 2007). Les rhamnolipides sont aussi un constituant de la matrice et joue le rôle de surfactant aux interfaces matrice/cellule permettant la formation de canaux d'eau dans le biofilm et le détachement de bactéries du biofilm pour coloniser de nouvelles surfaces (Davey et al., 2003). Ils jouent également le rôle de détergent permettant aussi bien à PA de se prémunir des attaques de cellules virales ou fongiques que des cellules phagocytaires du système immunitaire (Flemming and Wingender, 2010; Jensen et al., 2010).

1.1.5.2. Les facteurs de virulence sécrétés

PA sécrète aussi un grand nombre de molécules pour exercer sa virulence. Il s'agit, le plus souvent, d'enzymes et de toxines qui ont un fort potentiel de destruction des tissus et des cellules de l'hôte. Elles permettent de promouvoir l'invasion de PA chez l'hôte et d'altérer les capacités de défense de celui-ci. L'un des facteurs de virulence majeurs de PA est l'exotoxine A. Cette toxine est responsable après son interaction avec la cellule hôte, de l'arrêt de la synthèse protéique et provoque la mort de la cellule cible. La sécrétion de cette toxine par PA induit de graves dommages tissulaires chez l'hôte (Pavlovskis et al., 1978; Wick et al., 1990). De plus, PA synthétise et sécrète l'élastase qui permet la dégradation de l'élastine qui est une protéine structurante des tissus de l'hôte (Azghani, 1996). L'élastase permet donc l'invasion de PA dans les tissus mais également d'altérer la clairance mucociliaire de l'hôte. Le système de sécrétion de type III permet aussi à PA d'injecter des toxines à l'intérieur de la cellule hôte comme les cellules immunitaires responsables de la phagocytose afin d'empêcher leur action. Les toxines mises en jeu sont les exoenzymes S, T, U et Y (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY). ExoS est l'exoenzyme la mieux caractérisée, elle provoque la destruction de cytosquelette lorsqu'elle est injectée dans les cellules de l'hôte (Shaver and Hauser, 2004).

1.1.5.3. Les facteurs de virulence cellulaires

Pseudomonas aeruginosa possède également un grand nombre de facteurs de virulence cellulaires, qu'ils soient rattachés aux membranes de la bactérie ou présents dans le cytoplasme de celle-ci. PA possède notamment, un flagelle polaire et des *pili* qui sont impliqués dans sa motilité, son adhésion aux cellules de l'hôte ainsi qu'au processus inflammatoire (O'Toole and Kolter, 1998; Tang et al., 1995). Il a notamment été montré que le flagelle était nécessaire à l'adhésion précoce de PA sur un support afin de former le biofilm (Adamo et al., 2004; Arora et al., 1998; Bryan et al., 1998; DiMango et al., 1995; Feldman et al., 1998; Lillehoj et al., 2002). De plus, le récepteur TLR5 (Toll Like Receptor 5) présent sur certaines cellules du système immunitaire inné est capable de reconnaitre le flagelle de PA et plus précisément la flagelline (FliC). Cette reconnaissance TLR/FliC permet d'induire la sécrétion de cytokines et d'interleukines pour promouvoir la réponse inflammatoire de l'hôte. Cette réponse inflammatoire permet de combattre PA mais elle créée aussi un foyer inflammatoire et des dommages aux tissus de l'hôte qui sont favorables à la colonisation de PA (Hayashi et al., 2001). Pour ce qui est des *pili* de PA, il a été montré qu'ils sont impliqués dans un processus de rétraction/extension et d'adhésion aux surfaces appelé « Twitching mobility ». Les *pili* permettent à PA de se déplacer et de former des micro-colonies pour

initier la formation du biofilm (Hahn, 1997; Klausen et al., 2003; Vallet et al., 2001). Une étude récente a aussi dévoilé que les *pili* sont capables de réguler l'expression d'autres facteurs de virulence, notamment par l'activation du gène responsable de la synthèse de la β-lactamase (Persat et al., 2015).

Le lipopolysaccharide (LPS) est le constituant principal de la face externe de PA, il est constitué d'un lipide A inséré dans la membrane externe de PA, et d'un polysaccharide antigène O spécifique de PA. Le lipide A est aussi responsable de l'exacerbation de la réponse immunitaire de l'hôte et est à l'origine des chocs septiques. De plus, de nombreuses études ont essayé de tirer avantage de la signature de l'antigène O du LPS pour créer un vaccin sans succès aujourd'hui (Gupta et al., 1994; Pier, 2007, 2003).

Enfin, PA possède des lectines solubles qui sont impliquées dans sa virulence. Il s'agit de PA-IL et PA-IIL, deux lectines présentes principalement dans le cytoplasme de PA mais également sur la membrane externe (Glick and Garber, 1983). Leurs rôles dans le processus infectieux de PA seraient multiples. PA-IL serait impliquée dans la formation et stabilisation du biofilm, interviendrait dans l'adhérence de PA aux cellules épithéliales pulmonaires et aurait un effet cytotoxique sur celles-ci (Bajolet-Laudinat et al., 1994). PA-IIL, quant à elle, est capable d'inhiber *in vitro* le mouvement des battements ciliaires des cellules pulmonaires et participe à la formation du biofilm (Adam et al., 1997).

1.2. Les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*

Il vient d'être exposé que PA possède un arsenal de facteurs de virulence. Certains sont des lectines comme les lectines solubles, PA-IL et PA-IIL présentent dans le cytoplasme de PA. De plus, le flagelle de PA, possède, notamment, deux lectines : FliC et FliD. Les *pili* sont aussi composés de lectines comme PilA, PilY1 et CupB6 (Goldstein et al., 1980) (Figure 1-4).

Les lectines sont des protéines qui reconnaissent de façon spécifique et non covalente certains motifs saccharidiques sans les modifier. Elles sont donc dépourvues d'activité enzymatique et n'appartiennent pas au système immunitaire (Sharon and Lis, 2004). Les lectines peuvent également être appelées adhésines lorsqu'elles sont associées aux organelles de PA impliqués dans l'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes (flagelle, *pili*). Plus spécifiquement, la lectine responsable du filament du flagelle (FliC) peut être appelée flagelline et celle responsable du filament du *pili* de type IV (pilA), piline.

L'étude de ces lectines fait l'objet de cette thèse, le but étant de découvrir des ligands potentiels de ces lectines afin d'empêcher leur action biologique et de combattre les infections

causées par *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, ce chapitre décrira les structures des différentes lectines étudiées pendant cette thèse.

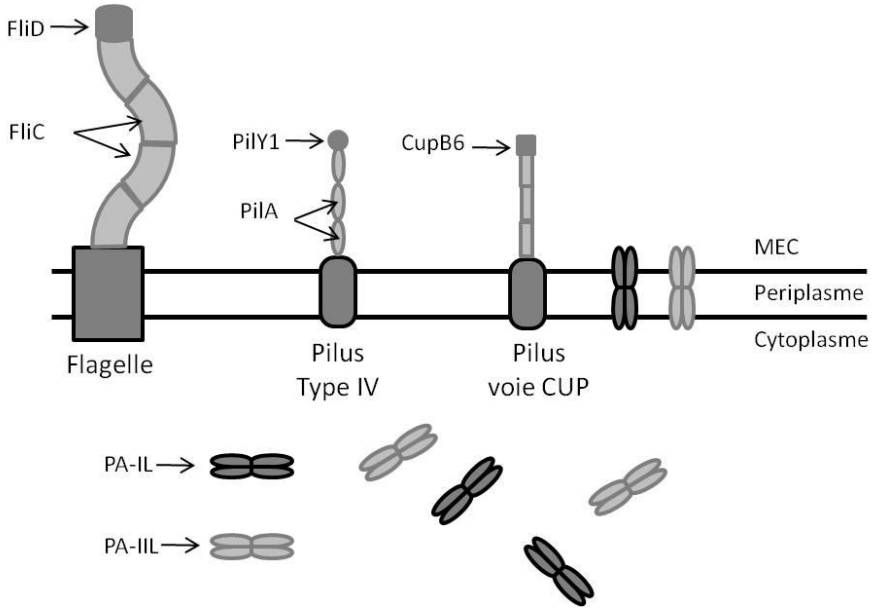


Figure 1-4 : Représentation des différentes lectines présentes chez Pseudomonas aeruginosa (MEC : matrice extracellulaire).

1.2.1. Les lectines du flagelle

Le flagelle est une structure complexe qui est composée de plus de 40 protéines et organisée en trois parties : le corps basal, le crochet et le filament. Le corps basal est ancré dans la membrane et joue le rôle de « moteur » en utilisant un gradient de protons comme source d'énergie pour assurer la rotation du flagelle. Le mouvement est ensuite transmis au crochet puis au filament flagellaire (Figure 1-5) (Chevance and Hughes, 2008). Le filament est constitué d'un cylindre creux composé de plusieurs monomères de la lectine FliC puis d'une coiffe en son extrémité : FliD (Bardy et al., 2003). FliD est nécessaire à la polymérisation du filament (Ikeda et al., 1996). Les lectines FliC et FliD présentent des variations selon la souche PAK ou PAO1 de PA, on parle de type A et B respectivement (Arora et al., 2000).

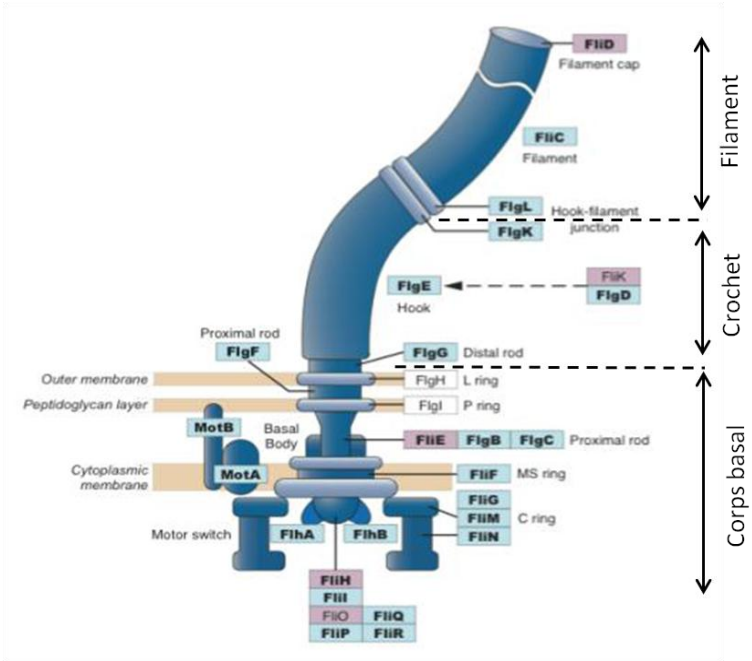


Figure 1-5 : Représentation schématique de la structure du flagelle. Adapté de http://www.cbs.dtu.dk/courses/mvnworkshop08/Ex_ProbeDesign/flagella.png.

1.2.1.1. FliC

FliC possède trois domaines : D0, D1 et D2 et la structure cristalline des domaines D1 et D2 a récemment été élucidée avec une résolution de 2.10 Å (réf. PDB : 4NX9) (Figure 1-6a). Le domaine D1 possède de grandes similarités avec ceux provenant de *Salmonella Typhimurium* et *Salmonella Dublin*. Grâce à des études comparatives, un modèle pour l'assemblage des monomères de FliC en filament a été proposé (Song and Yoon, 2014). Le domaine D1 serait impliqué dans la formation du tube constituant le filament, ces trois hélices α se positionnant à l'intérieur du tube et les deux feuillets β à l'extérieur. Les domaines D1 et D2 permettraient de faire des points de contact avec le domaine D1' d'une autre flagelline FliC. Le reste du domaine D2 serait exposé au milieu extérieur et pourrait être immunogène. Enfin les flagellines s'associeraient pour former un filament d'environ 15 nm de diamètre (Figure 1-6b).

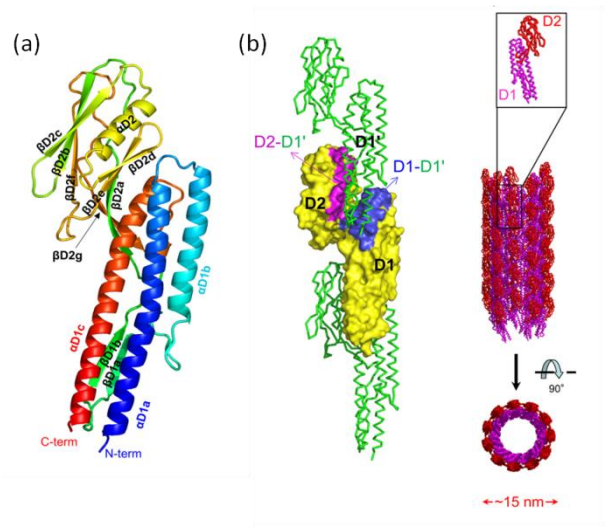


Figure 1-6 : Structure cristallographique du monomère de FliC (réf. PDB : 4NX9) (a) et modélisation de son assemblage en filament (b). Adapté de (Song and Yoon, 2014).

Plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier les motifs saccharidiques reconnus par FliC. Cependant, ces études ne semblent pas converger vers un motif unique. Une étude *in vitro* a montré que FliC est capable d'interagir avec GM1 et asialoGM1 qui sont des gangliosides présents sur la membrane des cellules épithéliales (Feldman et al., 1998). Une autre étude plus récente a permis d'identifier Muc1 comme un ligand potentiel de FliC (Lillehoj et al., 2002). Muc1 est une protéine fortement O-glycosylée (mucine) abondamment présente dans le mucus des voies respiratoires. Elle permet à PA d'adhérer aux tissus respiratoires pour créer le biofilm. 50 à 90 % du poids moléculaire de Muc1 sont des oligosaccharides, la détermination antigénique de ceux-ci varie d'un tissu à l'autre et d'un stade physiologique à l'autre (Gendler, 2001). Une étude réalisée par cytométrie de flux avec la souche sauvage PAO1 et un mutant pour l'expression de FliC a montré que FliC était capable d'interagir avec les motifs Lewis^{X} et pas avec les sialyl-LewisX (sLewis^{X}) (Scharfman et al., 2001). Reste que peu d'études décrivent l'interaction de FliC purifiée avec différents oligosaccharides. Néanmoins, nous nous sommes basés sur la publication de Scharfman *et al.* et nous avons sélectionné le Lewis^{X} comme ligand potentiel de FliC.

1.2.1.2. FliD

FliD constitue la coiffe du flagelle et semble être impliquée dans l'adhésion de PA aux cellules respiratoires à travers son interaction avec des mucines (Arora et al., 1998). La structure cristalline de FliD de *Pseudomonas aeruginosa* n'est aujourd'hui pas résolue. Cependant, une étude réalisée avec FliD issues de *Salmonella typhimurium* a estimé le poids moléculaire natif de FliD à environ 600 kDa et a montré grâce à des images de microcopie

électronique que les monomères de FliD (environ 50 kDa) s'assemblaient en deux pentamères pour former deux anneaux superposés (Ikeda et al., 1996) (Figure 1-7).

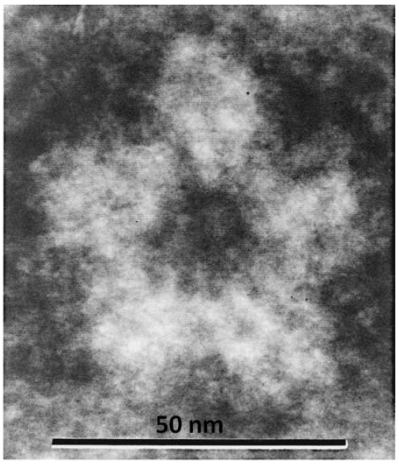


Figure 1-7 : Image de microcopie électronique du complexe pentamérique de FliD de Salmonella typhimurium (Ikeda et al., 1996).

De plus, une étude comparative des séquences de FliD provenant de la souche PAK et PAO1 a montré seulement 43 % d'identité suggérant que différents motifs saccharidiques pouvaient être reconnus par FliD d'une souche à l'autre (Arora et al., 2000). En effet, il a été montré par cytométrie de flux et test d'adhésion cellulaire que FliD provenant de la souche PAO1 est capable de reconnaitre les motifs Lewis^{X} et sLewis^{X}, à l'inverse de la souche PAK (Colomb et al., 2014; Scharfman et al., 2001). Plus récemment, il a été montré que le flagelle (FliD-FliC) est capable d'interagir avec le polysaccharide héparane sulfate de protéoglycannes présent sur la surface basolatérale de cellules épithéliales de poumons (Bucior et al., 2012).

1.2.2. Les lectines des *pili*

Deux types de *pili* sont présents chez PA, les *pili* de type IV et les *pili* assemblés par la voie « Chaperonne-Usher » (CUP).

1.2.2.1. PilA et PilY1 : lectines du pili de type IV

Les *pili* de type IV sont composés de plusieurs protéines dont la voie d'assemblage n'est pas totalement élucidée. Cependant, la piline majeure de ces *pili* est PilA, elle constitue le filament du *pili*. La piline PilY1 peut également être présente à l'extrémité de ces *pili* (Bardy et al., 2003) (Figure 1-8).

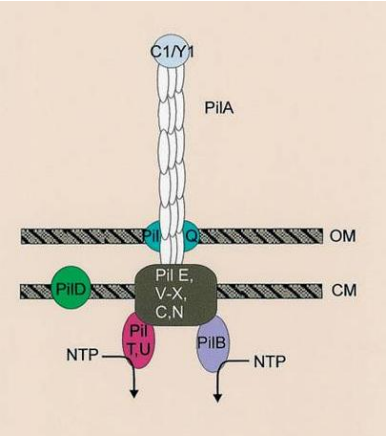


Figure 1-8 : Représentation schématique de la structure d'un pili de type IV (OM : Membrane externe, CM : Membrane cytoplasmique, NTP : Nucléoside triphosphate) (Bardy et al., 2003).

Il a été montré que ces *pili* de type IV sont capables d'interagir avec les N-glycannes présents sur la surface apicale de cellules épithéliales de poumons (Bucior et al., 2012).

La structure de différentes pilines, composant le filament du *pili* de type IV (comme PilA pour PA) et provenant de différents organismes, a été résolue et montre des similarités. En effet, les pilines possèdent toutes une longue hélice α hydrophobe N-terminale, des feuillets β C-terminal, une boucle reliant l'hélice α au feuillet β et une boucle DSL (disulfide-bonded loop) située à l'extrémité C-terminale de la protéine (Nguyen et al., 2010). Chez PilA de PA, une étude de mutagénèse dirigée sur la boucle DSL, a montré qu'elle est essentielle pour le repliement et la fonction de PilA (Harvey et al., 2009). L'extrémité N-terminale des pilines semble jouer un rôle dans la polymérisation des pilines pour former le filament tandis que l'extrémité C-terminale semble jouer le rôle de récepteur. La structure cristalline de PilA de la souche PAK de PA tronquée pour sa partie hydrophobe N-terminale a été résolue (1.63Å) (réf. PDB : 1DZO) (Hazes et al., 2000) (Figure 1-9a). A ce jour, sa structure cristalline en présence de son ligand n'a pas été obtenue. Néanmoins des études *in vitro* ont montré que PilA est capable d'interagir avec des glycosphingolipides asialo-GM1 et asialo-GM2 (Gupta et al., 1994; Saiman and Prince, 1993; Sheth et al., 1994). Seule la piline, PilA, présente à l'extrémité du filament, serait capable d'interagir avec les glycoconjugués (Emam et al., 2006). Une autre lectine présente sur les *pili* a été identifiée chez PA, il s'agit de PilY1. Sa structure a été cristallisée avec une résolution de 2.10 Å (réf. PDB : 3HX6) (Aim et al., 1996; Orans et al., 2010) (Figure 1-9b). Elle pourrait être présente à la fin du filament et aucun ligand n'est aujourd'hui connu pour cette lectine. Néanmoins, l'analyse de la structure de PilY1 et des essais *in vitro* ont montré que PilY1 possédait un domaine de liaison du calcium dont le rôle serait de permettre la rétraction du *pilus* pour la motilité de PA (Orans et al., 2010). Enfin, des études *in vitro*, ont montré que PilY1 était responsable de l'adhésion de PA

sur les tissus de l'hôte via l'interaction avec un récepteur présent à la surface basolatérale des cellules épithéliales. Ce récepteur n'est aujourd'hui pas identifié (Heiniger et al., 2010).

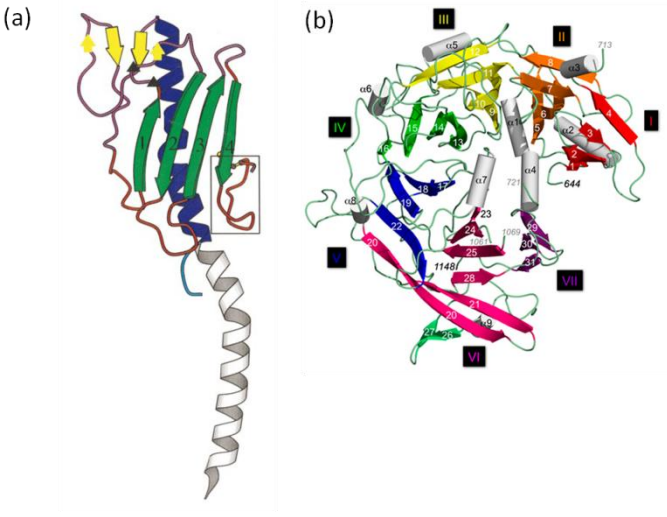


Figure 1-9 : Structure cristallographique de PilA de la souche PAK tronquée pour sa partie hydrophobe N-terminale (réf. PDB : 1DZO) qui a été modélisée (en gris) à partir de la structure de la piline de Neisseria gonorrhoeae (souche MS11) (a) Structure cristallographique du domaine C-terminal de PilY1 (réf. PDB : 3HX6) (b)

1.2.2.2. CupB6

D'autres *pili* assemblés par la voie « Chaperonne-Usher » (CUP) sont présents chez PA. Trois opérons *cupA*, *cupB* et *cupC* ont été mis en évidence chez PA, permettant la synthèse de trois types de *pili* CupA, CupB et CupC (Vallet et al., 2001). L'opéron *CupB* possède 6 gènes codant pour 6 protéines CupB1 à CupB6. CupB2 et CupB4 sont des protéines chaperonnes ; CupB1, les sous-unités du pilus et CupB6, une adhésine (Ruer et al., 2007). La voie d'assemblage des *pili* n'est pas connue aujourd'hui, cependant CupB2 semble être la chaperonne de CupB1 et CupB4 celle du complexe CupB4:CupB5:CupB6 (Cai et al., 2011). A ce jour, la structure cristalline de CupB6 ainsi que son ligand ne sont pas connus. Néanmoins une étude, sur une puce présentant 406 sucres, réalisée par le Consortium for Functional Genomics et demandée par A. Imberty en 2009, a montré que CupB6 (surexprimée chez *E. coli*) est capable d'interagir avec un motif Lewis B bien que le signal détecté soit faible (1065 u.a.) (http://www.functionalglycomics.org ; réf : primscreen_2536).

1.2.3. Les lectines solubles

Deux lectines solubles PA-IL et PA-IIL aussi appelées respectivement, LecA et LecB, sont largement décrites chez PA. PA-IL est spécifique du galactose, PA-IIL reconnait le fucose et elles sont toutes les deux dépendantes du Ca^{2+} pour être actives (Imberty et al., 2004). Ces deux lectines sont des tétramères avec un site de reconnaissance par monomère.

1.2.3.1. PA-IL

La lectine PA-IL fut découverte en 1972 grâce à un test d'hémagglutination d'érythrocytes traités à la papaïne en présence d'extrait de PA (Gilboa-Garber et al., 1972). C'est une protéine tétramérique dont chaque sous-unité possède un poids moléculaire de 12.7 kDa. Cette lectine est spécifique du galactose dont la constante d'association (K_a) mesurée par une dialyse à l'équilibre est de $3.4*10^4$ M^{-1} (Garber et al., 1992). Le co-cristal PA-IL/galactose a été obtenu en 2003 avec une résolution de 1.6 Å et montre qu'un atome de Ca^{2+} est nécessaire à l'interaction. Tous les groupements hydroxyles du galactose sont impliqués dans des liaisons hydrogènes avec PA-IL sauf O1. De plus, O3 et O4 sont impliqués dans des liaisons de coordination avec le Ca^{2+} (réf. PDB : 1OKO) (Cioci et al., 2003) (Figure 1-10).

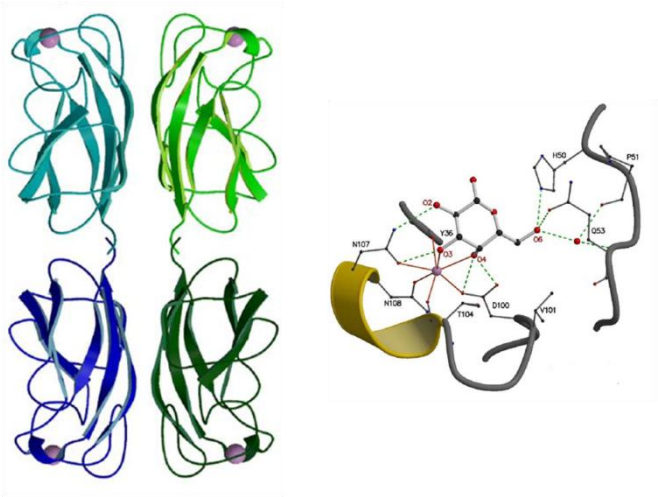


Figure 1-10 : Structure cristalline de PA-IL (a) et du site de liaison PA-IL/galactose avec les interactions mises en jeu (liaisons hydrogènes en pointillé vert et liaisons de coordination avec le Ca^{2+} en rouge) (b) (réf. PDB : 1OKO).

Suite à différents types de tests *in vitro*, il a été montré que PA-IL possède une préférence pour l'anomère α du galactose et qu'elle a une affinité croissante pour les disaccharides suivants : Galα1-3Gal, Galα1-4Gal et Galα1-6Glc (mélibiose) (Chen et al., 1998; Kirkeby and Moe, 2005; Lanne et al., 1994). Il a également été montré que PA-IL possède de l'affinité pour des glycoconjugués comme les antigènes P1, Pk et B des groupes sanguins. Le motif Gb3 (Galα1-4Galβ1-4Glc), présent sur les antigènes P des groupes sanguins, a été identifié comme le ligand naturel de PA-IL (Blanchard et al., 2008; Gilboa-Garber et al., 1994; Lanne et al., 1994; Zhang et al., 2010). Enfin, plus récemment le cristal de PA-IL avec le melibiose a permis d'identifier un deuxième site de liaison de sucre sur PA-IL où le glucose pourrait se fixer. Néanmoins, la force d'interaction entre cette deuxième poche de reconnaissance sur PA-IL et le glucose semble assez faible puisqu'elle n'a pas pu être quantifiée à travers le calcul d'une constante d'affinité (Blanchard et al., 2014).

1.2.3.2. PA-IIL

La lectine PA-IIL a été découverte 10 ans après PA-IL, en 1982 (Gilboa-Garber, 1982). Elle forme également un tétramère dont chaque monomère a un poids moléculaire de 11.7 kDa. C'est une lectine qui a une interaction naturellement forte de l'ordre du µM avec le L-Fucose (K_a =1.5 * 10^6 M^{-1}) et qui est aussi capable d'interagir avec le D-mannose (K_a =3.1 * 10^6 M^{-1}) (Garber et al., 1987). La structure cristalline du complexe PA-IIL/Fucose (résolution de 1.3 Å) a permis de mettre en évidence un mode d'interaction unique mettant en jeu deux atomes de Ca^{2+}. Tous les groupements hydroxyles du fucose sont impliqués dans des liaisons hydrogènes avec PA-IIL et des liaisons de coordination avec les deux atomes de Ca^{2+} sauf O1. En effet, O2 et O4 participent respectivement à la coordination du 1er et 2ème atomes de Ca^{2+} et O3 est impliqué dans des liaisons de coordination avec les deux atomes de Ca^{2+} (réf. PDB : 1GZT) (Loris et al., 2003; Mitchell et al., 2002) (Figure 1-11).

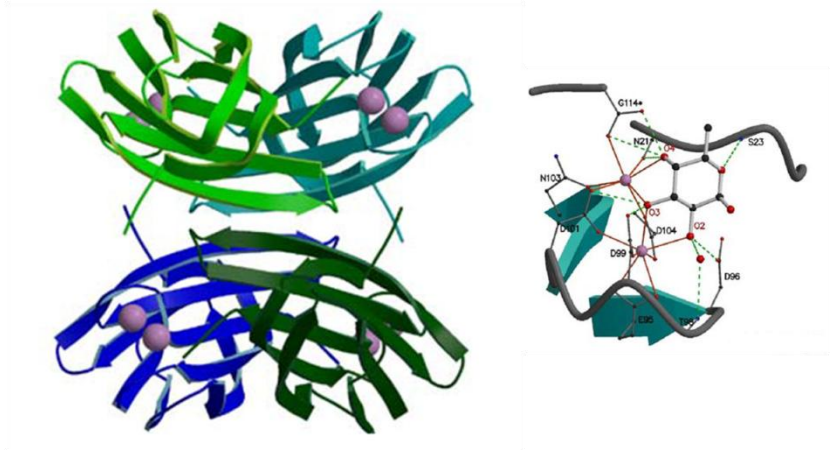


Figure 1-11 : Structure cristalline de PA-IIL (a) et du site de liaison PA-IIL/fucose avec les interactions mises en jeu (liaisons hydrogènes en pointillé vert et liaisons de coordination avec le Ca^{2+} en rouge) (b) (réf. PDB : 1GZT).

PA-IIL est également capable d'interagir avec les antigènes H des groupes sanguins mais aussi avec les antigènes type Lewis A ainsi que des oligosaccharides comme le 3-Fucosyllactose (Mitchell et al., 2002; Perret et al., 2005; Topin et al., 2013).

Il vient d'être décrit les propriétés de sept lectines (FliD, FliC, PilA, PilY1, CupB6, PA-IL et PA-IIL), qui sont des facteurs de virulence de PA, impliqués dans l'adhésion de PA aux cellules de l'hôte, dans la formation et/ou la maturation du biofilm de PA. Ces sept lectines sont des cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre les infections à PA. Le tableau 1-1 résume les propriétés de ces différentes lectines.

Nom	Rôles putatifs ou avérés	Ligands putatifs ou avérés	Réf.
PA-IL	Adhésion aux mucines et à la fibronectine, Stabilisation du biofilm, Cytotoxicité.	**Galactose** : Gal	(Garber et al., 1992)
		Disaccharides : Galα1-3Gal, Galα1-4Gal, Galα1-6Glc,	(Chen et al., 1998; Kirkeby and Moe, 2005)
		Antigène Gb3 : Galα1-4Galβ1-4Glc	(Blanchard et al., 2008)
		Antigène Pk : Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer	(Gilboa-Garber et al., 1994; Lanne et al., 1994)
		Antigène P1 : Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer	(Gilboa-Garber et al., 1994; Lanne et al., 1994)
		Antigène B : Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer	(Gilboa-Garber et al., 1994)
PA-IIL	Interaction bactérie/hôte et bactérie/bactérie Formation du biofilm, Cytotoxicité, Inhibition des mouvements ciliaires.	**Fucose** : Fuc	(Garber et al., 1987)
		Mannose : Man	(Garber et al., 1987)
		Antigène H : Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer	(Gilboa-Garber et al., 1994; Topin et al., 2013)
		Lewis A : Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc	(Mitchell et al., 2002; Topin et al., 2013)
		3FL : Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	(Mitchell et al., 2002; Perret et al., 2005)
FliD	Mobilité, Initiation de la formation du biofilm, Adhésion aux mucines.	**Lewis X** : Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc (Souche PAO1)	(Scharfman et al., 2001)
		sLewis X : Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc (Souche PAO1)	(Colomb et al., 2014; Scharfman et al., 2001)
FliC	Initiation de la formation du biofilm, Adhésion aux mucines, Stimulation du système immunitaire innée (via reconnaissance des TLR5).	**GM1** : Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc **aGM1** : Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	(Feldman et al., 1998)
		Lewis X : Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc (Souche PAO1)	(Scharfman et al., 2001)
		Mucine : Muc1	(Lillehoj et al., 2002)
Pil A	« Twitching mobility », Adhésion aux cellules de l'hôte, Formation du biofilm, Induit la réponse inflammatoire de l'hôte, Induit l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques.	**aGM1** : Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc **aGM2** : GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	(Gupta et al., 1994; Saiman and Prince, 1993; Sheth et al., 1994)
PiY1		Récepteur sur surface basolatérale des cellules épithéliales.	(Heiniger et al., 2010)
CupB6	Adhésion aux surfaces abiotiques, Formation du biofilm	**Lewis B** : Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc	CFG 2009 (Anne Imberty)

Tableau 1-1 : Rôles et ligands putatifs ou avérés des sept lectines de Pseudomonas aeruginosa étudiées.

1.3. Nouvelle stratégie de lutte contre les infections à PA

Nous venons de voir que *Pseudomonas aeruginosa* possède un arsenal de facteurs de virulence lui permettant d'exacerber sa pathogénicité. Parmi ceux-ci, nombreux sont des lectines reconnaissant spécifiquement des motifs saccharidiques. Le but de cette thèse est d'identifier des molécules pouvant inhiber ces types d'interactions et de comprendre les relations entre la structure de la molécule et l'affinité qu'elle a pour la lectine ciblée. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant les interactions sucre/lectine sont faibles. Or, pour pourvoir inhiber l'action de ces lectines, il faut des molécules de forte affinité. Ceci est atteignable grâce à la multivalence.

Dans un premier temps, il est important de définir les aspects thermodynamiques régissant une interaction entre une lectine et un sucre, puis ceux intervenant lors d'interactions multivalentes. Ensuite, les différents types de ligands multivalents portant des sucres seront présentés. Enfin, ceux ciblant les lectines de PA seront étudiés plus en détail.

1.3.1. Les interactions sucre/lectine

Les interactions monovalentes entre un ligand (sucre) et un récepteur (lectine) peuvent être décrites selon le concept clé/serrure d'Emil Fisher et sont régies par les lois de la thermodynamique.

1.3.1.1. Notion de thermodynamique

La thermodynamique repose sur deux principes fondamentaux. Le premier est la conservation de l'énergie. L'énergie ne peut être ni créée ni détruite mais seulement échangée au sein d'un système fermé. Le deuxième principe est que le système tend vers le désordre. En d'autres mots, au cours de réactions chimiques ou biochimiques, de l'énergie est échangée et du désordre est crée pour permettre la réaction. Afin de se rendre compte du sens de la réaction, la notion d'enthalpie libre de Gibbs (ou énergie libre) a été introduite, il s'agit du ΔG. Elle mesure la variation d'énergie utile pour que la réaction se fasse. A température et pression constantes, elle permet d'évaluer la partie de l'énergie potentielle du système qui n'est pas dissipée de manière irréversible dans la création de désordre (entropie). Elle est définie selon la formule suivante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \text{Équation 1-1}$$

Où ΔH représente l'enthalpie (variation d'énergie totale) du système et TΔS représente la création de désordre.

ΔG permet de décrire le sens d'une réaction, s'il est négatif cela signifie que la réaction est spontanée ; s'il est égal à zéro, la réaction est à l'équilibre et s'il est positif cela signifie que la réaction est non spontanée et a besoin d'énergie pour se faire (ex : apport de chaleur).

Afin de pouvoir comparer différentes réactions et enthalpies libres, des conditions standards de température, pression, pH ont été définies. En chimie, il s'agit d'une température T = 25°C, d'une pression P = 1 atm et d'un pH = 7. On parle alors d'enthalpie libre de Gibbs standard, $\Delta G°'$.

De plus, les données enthalpiques et entropiques d'une interaction ligand/récepteur (monovalent) peuvent être divisées en plusieurs composantes. Ainsi, l'enthalpie totale (ΔH) d'une interaction récepteur/ligand (RL) comprend une enthalpie de liaison (ΔH_{RL}), de conformation (ΔH_{conf}) et de contribution du solvant (ΔH_{sol}) :

$$\Delta H = \Delta HRL + \Delta Hconf + \Delta Hsol \qquad \text{Équation 1-2}$$

ΔH_{RL} correspond au changement d'enthalpie nécessaire à la création de la liaison. Dans le cas des interactions sucre/lectine, il s'agit de liaisons faibles type liaison hydrogène, liaison de Van der Walls ou interaction dipôle-dipôle. ΔH_{conf} fait référence aux changements de conformation des groupements portés par le récepteur et le ligand pour permettre la liaison, comme par exemple, la rotation des hydroxyles pour créer une liaison hydrogène. Enfin, le ΔH_{sol} rend compte de la contribution du solvant pour permettre l'interaction.

L'entropie totale (ΔS) du système monovalent dépend quant à elle de quatre composantes :

$$\Delta S = \Delta Srot + \Delta Strans + \Delta Sconf + \Delta Ssol \qquad \text{Équation 1-3}$$

L'entropie translationnelle ($\Delta Strans$) correspond à la liberté qu'a la molécule de se déplacer dans les trois dimensions (x, y et z), l'entropie de rotation ($\Delta Srot$) correspond à sa liberté de rotation autour d'un axe, l'entropie de conformation ($\Delta Sconf$) correspond, quant-à elle, à la liberté de la molécule à adopter une conformation donnée. Et enfin l'entropie de solvatation ($\Delta Ssol$) fait référence aux changements d'environnement aqueux autour du site de liaison comme le déplacement de molécule d'H_2O pour permettre l'interaction.

De manière générale, l'interaction d'un ligand avec un récepteur induit une diminution de l'entropie de rotation et de translation puisqu'à la fois le ligand et le récepteur perdent des degrés de liberté lors de leur interaction. L'interaction induit également une augmentation de l'entropie de solvatation grâce à une augmentation du désordre lors des déplacements des molécules de solvant pour permettre cette interaction (Mammen et al., 1998; Reynolds and Perez, 2010).

1.3.1.2. Notion de constante d'équilibre

S'il on considère une réaction entre un ligand (L) et un récepteur (R) pour former le complexe récepteur/ligand (RL) :

$$R + L \leftrightarrow RL \qquad \text{Équation 1-4}$$

Il est possible de relier l'enthalpie libre standard à la constante d'équilibre (K) par la formule suivante :

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT\,ln\,(Ka) \text{ où } Ka = \frac{[RL]}{[R]*[L]} \qquad \text{Équation 1-5}$$

K_a représente la constante d'équilibre ou constante d'association, elle caractérise l'état d'équilibre de la réaction et ne dépend que de la réaction considérée et de la température. Elle est généralement exprimée en M^{-1}. Il peut également en être déduit la constante de dissociation de la réaction K_d qui correspond à l'inverse de K_a. Plus la constante K_a est grande, plus le ΔG°' sera petit, plus la réaction sera en faveur de la formation du complexe et donc plus l'affinité entre le récepteur et le ligand sera grande.

Concernant les lectines, l'interaction monovalente avec un sucre est généralement faible avec des constantes de dissociation de l'ordre du µM au mM. C'est notamment ce qui a été décrit plus haut pour PA-IL et PA-IIL (Garber et al., 1987; Gilboa-Garber et al., 1972). Néanmoins, de nombreuses études ont montré que des interactions multiples étaient mises en jeu pour augmenter la force d'interaction entre la lectine et le sucre et obtenir une réponse biologique (Lee and Lee, 1995). Le phénomène a été décrit pour le première fois en 1974, où des glycoprotéines présentant 4 fois plus de galactoses avaient une affinité 10 000 fois plus grande pour des lectines hépatiques (récepteurs aux asialoglycoprotéines) (Ashwell and Harford, 1982; Ashwell and Morell, 1974).

1.3.2. La multivalence

1.3.2.1. Intérêt biologique d'une interaction multivalente

Outre, l'augmentation de la force d'interaction entre un ligand et un récepteur, les interactions multivalentes peuvent permettre pour la cellule de moduler un processus biologique. En considérant un récepteur et un ligand multivalent, il est possible de définir différents niveaux d'interaction suivant le nombre d'interactions mises en jeu entre le ligand et le récepteur. Chaque niveau pourrait être porteur d'une information biologique et permettrait ainsi de moduler la réponse biologique (Mammen et al., 1998).

Les processus de reconnaissance cellulaire ou de transduction de signal par la cellule sont souvent dépendants d'interactions multiples entre un récepteur cellulaire et un ligand. La

couche bilipidique de la membrane cellulaire est composée de nombreux saccharides et protéines qui suivant leur arrangement peuvent conduire à une interaction multivalente avec un ligand. Ces interactions physiologiques sont souvent très hétérogènes ce qui rend difficile l'analyse du mécanisme moléculaire de l'interaction (Kiessling et al., 2000). Néanmoins, quelques exemples sont reportés dans la littérature. Ces interactions multivalentes ne concernent pas uniquement les interactions sucre/protéine mais on les retrouve aussi dans le cadre des interactions anticorps/antigène. Par exemple, le phénomène de phagocytose de pathogènes induite par l'opsonisation serait sous le contrôle d'interactions multivalentes entre le récepteur Fc et le fragment Fc des anticorps. Dans le cas d'une interaction sucre/lectine, il peut être décrit le phénomène de dégradation d'asialoglycoprotéines par les cellules hépatiques. Ces cellules présentent des récepteurs aux asialoglycoprotéines capables d'interagir avec le galactose de glycoprotéines dont l'acide sialique terminal a été éliminé permettant l'exposition du galactose. L'interaction multivalente de plusieurs récepteurs avec plusieurs galactoses portés par une glycoprotéine est un signal biologique permettant l'endocytose de la glycoprotéine par les hépatocytes en vue de sa dégradation. Afin de mieux comprendre ces interactions multivalentes, de nombreuses études ont été faites avec des ligands multivalents agissant comme inhibiteurs ou effecteurs d'une réponse biologique.

1.3.2.2. Les différents mécanismes de multivalence

Avant de discuter du « cluster glycoside effect », il faut faire la distinction avec le phénomène de coopérativité. La coopérativité est mise en place lorsque l'association d'un ligand dans un site de liaison du récepteur influence l'affinité d'un deuxième ligand pour un second site de liaison présent sur le récepteur. Cette coopérativité peut-être positive (synergie) si la première association augmente l'affinité des suivantes, négative si l'affinité diminue ou nulle (additivité) si l'affinité est inchangée. L'exemple le plus connu de coopérativité positive est la coopérativité allostérique décrite par le système hémoglobine/O_2 qui engendre des changements conformationnels et de polarisation du récepteur après la liaison de la première molécule d'O_2 qui favorise la liaison des suivantes (Hunter and Anderson, 2009).

La coopérativité se distingue donc du « cluster glycoside effect » par le fait que les sites de liaison du récepteur sont dépendants les uns des autres. La multivalence décrit une augmentation des forces d'interactions pour des récepteurs multivalents ayant des sites de liaison indépendants. On parle d'affinité ou d'avidité selon le caractère monovalent ou multivalent de l'interaction. Afin de simplifier le discours, le terme affinité a été utilisé dans ce manuscrit.

Les phénomènes de multivalence peuvent se faire suivant différents types de mécanismes (Cecioni et al., 2015; Gestwicki et al., 2002). Les interactions intermoléculaires entrainent des phénomènes de réticulation entre le ligand et le récepteur pouvant conduire à leur agrégation. La figure 1-12 présente les mécanismes de multivalence intramoléculaire c'est-à-dire mettant en jeu une seule molécule de ligand multivalent.

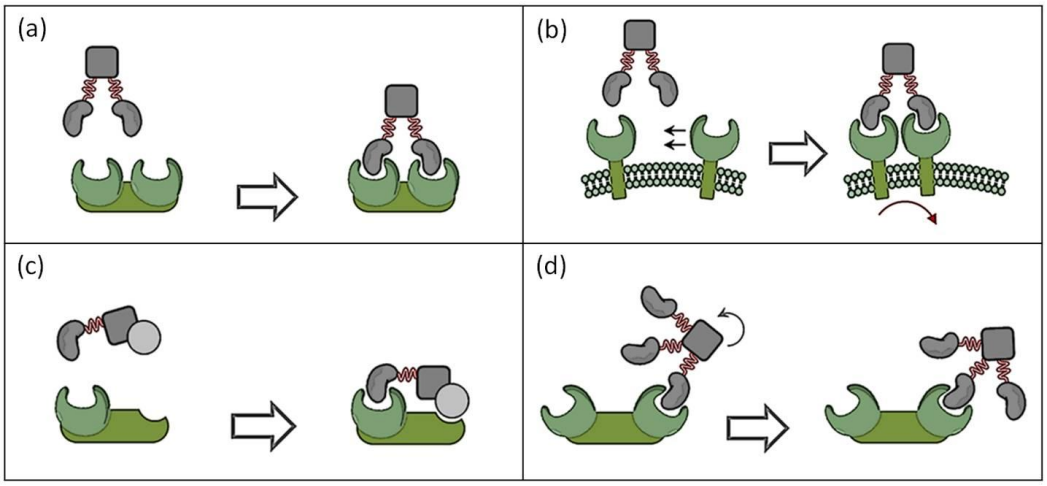


Figure 1-12 : Les différents mécanismes d'interactions multivalentes intramoléculaires : association par chélation (a), regroupement de récepteurs (b), association au sous-site (c) et réassociation statistique (d). Adapté de (Cecioni et al., 2015).

Le mécanisme le plus décrit dans la littérature est celui faisant intervenir l'interaction simultanée entre n sites de liaisons du récepteur et m ligands portés par une même molécule. Il est souvent nommé mécanisme d'association par chélation (Figure 1-12a). Ce type d'interaction multivalente est à l'origine d'une augmentation forte d'interaction entre le ligand et le récepteur comparé à une interaction monovalente. Dans le cas d'une interaction multivalente sucre/lectine, il s'agit dans la plus part des cas du phénomène appelé « cluster glycoside effect », il sera décrit dans le paragraphe suivant. Dans la littérature, de nombreux ligands multivalents ont été décrits pour cibler des lectines de différents organismes souvent dans le but de les inhiber pour traiter certaines maladies. Peu de structures cristallines d'un ligand multivalent en complexe avec son récepteur sont disponibles (Wittmann and Pieters, 2013). Néanmoins, les toxines Shiga font partie d'une famille de lectines formées de deux sous-unités A et B. La sous-unité B est un pentamère dont chaque monomère peut lier jusqu'à trois ligands Gb3 (Galα1-4Galβ1-4GlcβCer). De nombreux ligands multivalents ont été synthétisés afin de cibler cette toxine présente notamment chez *Shigella dysenteria* et *Escherichia coli* enterohémorragique (EHEC) et qui est responsable de graves diarrhées. Un de ces ligands multivalents est un composé décavalent présentant cinq bras sur lesquels deux motifs Gb3 sont présents, ce ligand est appelé « Starfish » (Figure 1-13a). Il présente un effet

inhibiteur plus d'un million de fois plus élevé que le ligand Gb3 seul. La structure cristalline de la toxine avec ce ligand multivalent « Starfish » a été résolue et montre que le ligand se lie à deux toxines. Il se forme alors une structure en sandwich avec une molécule de « Starfish » entre deux sous-unités pentameriques B de deux toxines. Chaque bras possède deux Gb3 qui se lient avec l'une et l'autre des sous-unités B. Ainsi, il y a cinq Gb3 présents sur 5 bras du ligand « Starfish » qui lient simultanément la sous-unité B de la toxine n°1 et les cinq autres qui lient la sous-unité B de la toxine n°2 pour former un sandwich (Figure 1-13b et c). Avec ce type de ligand, il y a un phénomène de multivalence lié à la fois à un mécanisme de chélation et à un mécanisme de réticulation faisant intervenir des interactions intermoléculaires (Kitov et al., 2000).

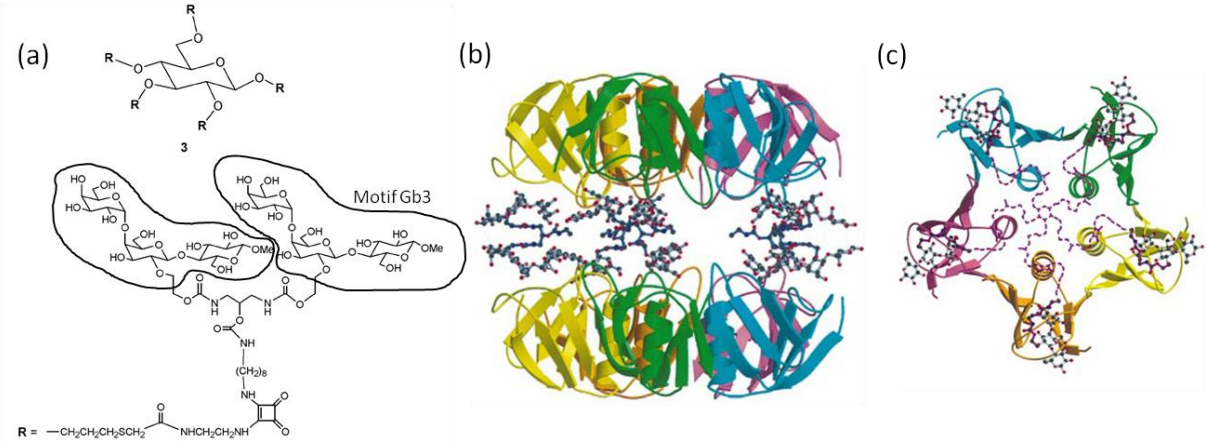


Figure 1-13 : Structure du ligand décavalent « Starfish » (a) et structure cristallographique du sandwich vu de face formé de deux pentamères de la sous-unité B de la toxine Shiga reliés par un ligand « Starfish » (b) et de la moitié du sandwich vu du dessus (c). Adapté de (Kitov et al., 2000).

Un autre mécanisme de multivalence décrit est celui du regroupement de récepteurs « receptor clustering » qui met en jeu des récepteurs monovalents ancrés dans la bicouche lipidique de la membrane et qui sont capables de diffuser afin de se regrouper pour lier un ligand multivalent (Figure 1-12b). Ce type de mécanisme est souvent à l'origine de la transduction de signaux à travers la cellule (Kiessling et al., 2006). Les phénomènes décrits dans le paragraphe précédent 1.3.2.1 comme celui de l'opsonisation sont induits par le regroupement de récepteurs.

Un autre mécanisme de multivalence consiste en un récepteur présentant deux sites de liaison différents : un site principal et un sous-site d'association au récepteur. Ce second site présente une affinité et spécificité différente du site principal (Figure 1-12c). Des ligands heterobivalents sont capables d'interagir avec ces récepteurs et d'augmenter la force d'interaction par rapport à une interaction monovalente.

Enfin, l'utilisation de ligands multivalents peut augmenter la concentration locale en ligand près du récepteur et induire une augmentation d'affinité même lors d'une interaction monovalente (Figure 1-12d). Le ligand a ainsi une plus grande probabilité de rencontrer le récepteur, il s'agit du phénomène de réassociation statistique (Cecioni et al., 2015).

1.3.2.3. La multivalence avec le système lectine/sucre

Dans le cas d'une interaction multivalente avec le système lectine/sucre, on parle du phénomène : « cluster glycoside effect ». Ce phénomène, défini pour la première fois en 1995, nécessite la présence d'une lectine avec plusieurs domaines de reconnaissance (« carbohydrate recognition domain» (CRD)) et d'un ligand multivalent présentant une bonne orientation dans l'espace des sucres pour favoriser l'interaction avec les CRD (Lee and Lee, 1995). Ce phénomène induit l'exaltation de l'affinité par sucre pour une interaction entre une lectine multivalente et un ligand multivalent par rapport à une interaction monovalente lectine/sucre. De plus, il n'existe pas de relation entre valence du ligand ou de la lectine et importance de l'effet cluster bien qu'il y a une tendance à l'augmentation de la force d'interaction avec l'augmentation de la valence (Lundquist and Toone, 2002).

Le « cluster glycoside effect » repose sur une contribution entropique et nécessite une bonne topologie du ligand multivalent pour se fixer aux CRD. Dans l'idéal, un ligand multivalent ayant une structure rigide et étant parfaitement complémentaire des sites de liaison de la lectine, permettrait d'avoir un « cluster glycoside effect » maximal. Cependant, cette structure idéale est très difficilement atteignable dans la pratique puisqu'il faudrait ajuster parfaitement les deux molécules à l'échelle de l'atome. C'est pourquoi, le ligand multivalent doit être capable de se déformer pour entrer dans les sites de liaison de la lectine, il faut donc apporter de la flexibilité à la structure et ainsi minimiser le coût enthalpique de l'interaction. Néanmoins, cette flexibilité apporte un coût entropique lors de la formation du complexe par la perte de degré de liberté. C'est pourquoi, Il est nécessaire d'optimiser la topologie du ligand multivalent et de faire un compromis entre le coût entropique et enthalpique de la formation du complexe afin d'obtenir un « cluster glycoside effect » optimal.

1.3.2.4. Bases thermodynamiques des interactions multivalentes

Plusieurs modèles thermodynamiques ont été proposés afin de comprendre les bases moléculaires des interactions multivalentes. Essentiellement deux modèles ressortent, il s'agit de celui de Whitesides en 1998 et de Jencks en 1981 étendu plus récemment par Bundle (Jencks, 1981; Kitov and Bundle, 2003; Mammen et al., 1998). Les deux modèles ont été

vérifiés expérimentalement et sont assez proches dans l'interprétation de l'effet chélate. Cependant, ils diffèrent dans l'expression des énergies libres d'association et de leurs composantes.

Ces modèles supposent quelques pré-requis comme le fait que les sites de liaison soient indépendants et qu'ils aient les mêmes caractéristiques d'affinité pour le ligand. De plus, le phénomène d'agrégation n'est pas décrit avec ces modèles.

Whitesides *et al.* ont décrit l'interaction multivalente à travers l'additivité des composantes thermodynamiques. Ainsi, les équations suivantes peuvent être écrites :

$$\Delta G_n^{multi} = n\Delta G_{moy}^{multi} \qquad \text{Équation 1-6}$$

$$K_n^{multi} = (K_{moy}^{multi})^n \qquad \text{Équation 1-7}$$

Où l'énergie libre de l'association globale entre un récepteur multivalent et un ligand multivalent (ΔG_n^{multi}) correspond à l'énergie libre moyenne de chacune des interactions (ΔG_{moy}^{multi}) multipliée par le nombre d'interaction, n. L'équation 1-7 définit la constante d'association globale qui est aussi appelée avidité de l'association. Afin de décrire l'augmentation d'affinité dans le cas des interactions multivalentes, le facteur d'amélioration β a été défini. Il reflète le ratio entre la constante d'association globale et la constante d'association monovalente, plus ce paramètre β est élevé, plus l'effet chélate est important.

Au niveau des composantes enthalpiques et entropiques, Whitesides *et al.* ont utilisé les relations classiques de la thermodynamique des interactions en équilibre (Équation 1-8).

$$\Delta G_n^{multi} = \Delta H_n^{multi} - T\Delta S_n^{multi} \qquad \text{Équation 1-8}$$

Au niveau enthalpique, si les sites de liaison sont indépendants et que la reconnaissance du ligand multivalent pour le récepteur est optimale (reconnaissance parfaite), l'additivité des enthalpies monovalentes s'applique (Figure 1-14a). Par contre, si la topologie du ligand multivalent ne permet pas une bonne reconnaissance (exemple : distance entre deux motifs trop petite), le gain enthalpique sera inférieur à la somme des enthalpies monovalentes du fait de la déformation des liaisons (Figure 1-14b).

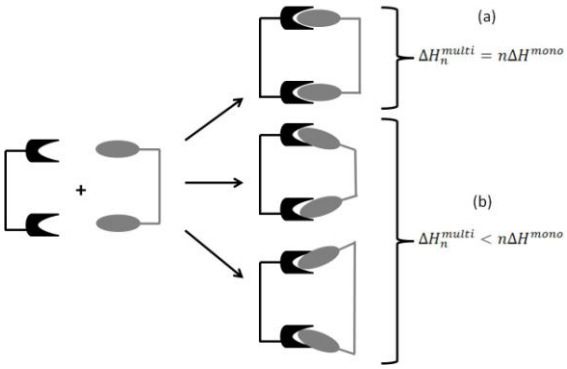


Figure 1-14 : Représentation des changements d'enthalpie pour une interaction multivalente dans le cas d'un ligand multivalent rigide à géométrie parfaitement complémentaire au récepteur (a) et de ligands ayant un linker trop court ou trop long (b).

Au niveau entropique, les composantes translationnelle, rotationnelle, conformationnelle et de solvatation sont impliquées (cf. 1.3.1.1) :

$$\Delta S_n^{multi} = \Delta S_{trans,\ n}^{multi} + \Delta S_{rot,\ n}^{multi} + \Delta S_{conf,\ n}^{multi} + \Delta S_{sol,\ n}^{multi} \quad \text{Équation 1-9}$$

Lors d'une interaction multivalente, le coût translationnel et rotationnel est équivalent à une interaction monovalente pour le premier évènement d'association. Pour les suivantes, l'association se ferait alors de manière intramoléculaire sans coût translationnel et rotationnel supplémentaire. Dans le cas d'un ligand ayant une topologie qui « match » parfaitement avec le récepteur, il n'y aura pas de coût conformationnel, l'interaction est entropiquement favorisée. Par contre, dans la plupart des systèmes de la flexibilité est introduite dans la structure du ligand pour permettre l'interaction avec le récepteur. Ceci a pour conséquence d'introduire un coût conformationnel dans le sens où, le nombre de conformations possibles du ligand est plus important avant la complexation avec le récepteur qu'après. Néanmoins, si ce coût conformationnel est inférieur aux coûts translationnel et rotationnel d'une interaction monovalente, l'interaction multivalente ligand/récepteur est toujours entropiquement favorisée. Enfin, l'entropie de solvatation est souvent reliée à l'entropie des molécules d'H_2O qui entourent le site de liaison du ligand sur le récepteur. En général, l'interaction entraine une libération de molécules d'H_2O et ainsi une augmentation de l'entropie du système.

Kitov et Bundle ont proposé un modèle thermodynamique des interactions multivalentes qui se base sur le modèle développé par Jencks. Ce modèle utilise également l'additivité des énergies libres en ajoutant un terme qui symbolise l'énergie libre de connexion (Équation 1-10). Dans le cas d'une interaction divalente, il s'agit par exemple, du changement d'énergie causé par la connexion des deux ligands au récepteur bivalent. Il représente les effets favorables ou non de cette interaction.

$$\Delta G_n^{multi} = n\Delta G^{mono} + \Delta G_{connexion} \qquad \text{Équation 1-10}$$

Le modèle introduit également un facteur statistique qui permet de rendre compte du nombre de possibilités équivalentes pour effectuer l'interaction multivalente. Ce facteur statistique a été appelé « entropie d'avidité ». Si l'on considère i interactions entre un récepteur et un ligand multivalent, il est possible d'écrire la relation suivante :

$$\Delta G_i = \Delta G_{inter} + (i-1)\Delta G_{intra} + RT\ln\Omega_i \qquad \text{Équation 1-11}$$

Où ΔG_{inter} représente la première interaction entre un ligand et un récepteur multivalent (elle équivaut à ΔG_{mono}) et ΔG_{intra} représente la nature intramoléculaire des interactions suivantes. Le coefficient de dégénérescence Ω_i introduit le fait que le complexe multivalent récepteur/ligand n'est pas une molécule individuelle mais un ensemble de complexes microscopiques récepteur/ligand dans lesquels plusieurs arrangements sont possibles (Équation 1-12). Enfin chaque complexe microscopique peut être pondéré par sa probabilité, w_i, par une loi de distribution de Boltzmann. Ainsi dans ce modèle, la constante d'association globale ne peut pas être définie par K_n^{multi} puisque le facteur statistique ne serait pas pris en compte. C'est pourquoi, le terme $K_{avidité}$ a été introduit (Équation 1-13). Il permet de prendre en compte les différents intermédiaires et représente l'effet cumulatif de ceux-ci.

$$R + L \xleftrightarrow{K_{avidité}} RL\,(1) + RL\,(2) + \ldots + RL(i) \qquad \text{Équation 1-12}$$

$$K_{avidité} = \frac{\sum[RL(i)]}{[R][L]} = \sum_{i=1}^{i_{max}} K_i \qquad \text{Équation 1-13}$$

Enfin, en connaissant le poids (w_i) de chaque complexe microscopique, l'énergie libre d'interaction multivalente notée ici $\Delta G_{avidité}$ peut être défini selon l'équation 1-14:

$$\Delta G_{avidité} = \Delta G_{inter} + \Delta G_{intra} \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i\,(i-1) + RT \sum_{i=1}^{i_{max}} w_i \ln(w_i/\Omega_i) \qquad \text{Équation 1-14}$$

Les contributions enthalpiques sont contenues dans les 1er et 2ème termes. Les améliorations d'interactions dues à la multivalence sont contenues dans les 2ème et 3ème termes qui représentent respectivement, les interactions ligand/récepteur spécifiques et l'effet du facteur statistique soit l'entropie d'avidité.

Plus récemment, Krishnamurthy *et al.* ont proposé un modèle pour le calcul d'énergie libre d'interactions multivalentes prenant en compte les deux modèles décrits ci-dessus (Krishnamurthy et al., 2006) :

$$\begin{aligned}\Delta G_i^{multi} = {} & i\Delta H_{affinité} - i\Delta S_{affinité} + (i-1)T\Delta S_{trans+rot} + (i-1)\Delta H_{RL} \\ & - (i-1)T\Delta S_{conf} + (i-1)\Delta G_{coop} - RT\ln(\Omega_i/\Omega_0)\end{aligned} \qquad \text{Équation 1-15}$$

Les deux premiers termes ($i\Delta H_{affinité} - i\Delta S_{affinité}$) représente l'énergie libre d'interaction observée si l'interaction entre i récepteurs et ligands se faisait de manière indépendante, il s'agit de la somme des interactions monovalentes. Le 3ème terme $[(i-1)T\Delta S_{trans+rot}]$ est en relation avec l'effet chélate où la perte des entropies translationnelle et rotationnelle est supportée par la première interaction. Le 4ème terme $[(i-1)\Delta H_{RL}]$ traduit la perte ou le gain enthalpique dus à la topologie du ligand qui induit soit un « match » imparfait entre les sites de liaison du récepteur et le ligand soit l'apparition d'interactions supplémentaires entre le récepteur et le ligand ce qui renforce l'interaction (Kane, 2010). Le 5ème terme $[(i-1)T\Delta S_{conf}]$ rapporte la perte d'entropie liée à la perte de liberté de conformation de la topologie du ligand après sa première interaction. Ces cinq premiers termes reprennent le modèle développé par Whitesides. Le 6ème terme $[(i-1)\Delta G_{coop}]$ reflète l'effet de coopérativité entre les différents sites de liaison du récepteur. Ce terme est généralement proche de zéro puisque comme expliqué dans le paragraphe précédent (cf. 1.3.2.2), il est considéré que les différents sites de liaison sont indépendants. Enfin le dernier terme traduit le facteur statistique introduit dans le modèle de Kitov et Bundle et appelé entropie d'avidité.

La compréhension de ces interactions multivalentes d'un point de vue thermodynamique permet de rendre compte de l'influence de différents paramètres sur la force d'interaction du complexe ligand/récepteur multivalent. Ainsi, il a été souligné que la topologie du ligand multivalent pouvait grandement influencer l'enthalpie de liaison. Si la distance entre les deux épitopes d'un ligand divalent est trop courte, l'enthalpie de liaison du ligand sur le récepteur sera diminuée. De même, pour pallier à ce problème, de la flexibilité entre deux épitopes peut être apportée mais cela aura un coût entropique de conformation lors de la liaison avec le récepteur. La synthèse de ligands multivalents à des fins thérapeutiques comme la synthèse de glycoclusters pour cibler des facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* implique donc de faire des compromis dans la topologie du glycocluster afin d'obtenir un « cluster glycoside effect » optimal.

1.3.3. Les différentes structures de glyco-ligands multivalents

Après avoir abordé les principes de la multivalence et son intérêt notable dans le développement de nouveaux traitements thérapeutiques, un état de l'art des différentes structures de ligands multivalents présentant des sucres va être présenté. Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive puisque de nombreuses synthèses de ligands multivalents sont décrites dans la

littérature mais, de donner les principales caractéristiques de chaque type de ligand multivalent (Müller et al., 2016; Renaudet and Roy, 2013).

1.3.3.1. Les glycopolymères

Les glycopolymères sont des polymères présentant plusieurs motifs saccharidiques. Ils permettent d'obtenir une structure avec une valence très élevée, jusqu'à plusieurs centaines de sucres par polymère. Ils peuvent être préparés soit à partir de polymères naturels comme l'alginate ou le polyglutamate, soit à partir de polymères synthétiques comme le polyacrylate. Les polymères naturels présentent l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables ce qui est un atout pour la vectorisation des médicaments. La synthèse des glycopolymères peut se faire par différents types de polymérisation dont la polymérisation vivante (« Living polymérisation »). Différentes méthodes comme l'ATRP (« Atom-Transfer Radical Polymerization »), RAFT (« Reversible Addition-Fragment chain Transfer ») ou encore ROMP (« Ring-Opening Metathesis Polymerization ») utilisent la polymérisation vivante. Ce type de polymérisation permet de produire des glycopolymères avec une masse moléculaire précise présentant peu de polydispersité. De plus, cela permet d'obtenir suivant les conditions de polymérisation des glycopolymères présentant des sucres de manière plus ou moins espacés (Miura, 2012; Voit and Appelhans, 2010). Kiessling *et al.* ont notamment utilisé la méthode ROMP pour effectuer la synthèse de glycopolymères avec différentes densités de mannoses capables d'interagir avec la lectine ConA. Ils ont montré que la densité en résidus mannoses du glycopolymère influence le phénomène de « receptor clustering » et la stœchiométrie du complexe (Cairo et al., 2002; Gestwicki et al., 2002). De plus, des glycopolymères formant un hydrogel auquel est greffé les antigènes B du groupe sanguin humain ont été synthétisés pour leur capacité à piéger les norovirus. Il a été montré que les norovirus qui sont des virus causant des diarrhées aiguës pouvaient interagir via leurs protéines de surface avec les antigènes B de l'hydrogel et être retenus par celui-ci. Cet hydrogel est biocompatible et représente donc un potentiel pour le développement de médicaments antiviraux (Zhang et al., 2006).

1.3.3.2. Les glycodendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules globulaires, monodisperse avec un nombre de branches important. Ces branches viennent d'un cœur central multifonctionnel et se terminent par un groupe fonctionnel, sucre pour les glycodendrimères. Les glycodendrimères présentent l'avantage d'avoir une taille plus petite que les glycopolymères avec moins de dispersion

(Cloninger, 2002). Ils peuvent présenter plusieurs dizaines jusqu'à quelques centaines de sucres. La synthèse des glycodendrimères peut principalement se faire de deux manières : divergente ou convergente. Avec la synthèse divergente, les branches sont construites à partir du cœur, avec un doublement du nombre de groupements réactifs à chaque génération du glycodendrimère (Figure 1-15a). Avec la synthèse convergente les branches sont construites à part, puis rattachées au cœur (Figure 1-15b).

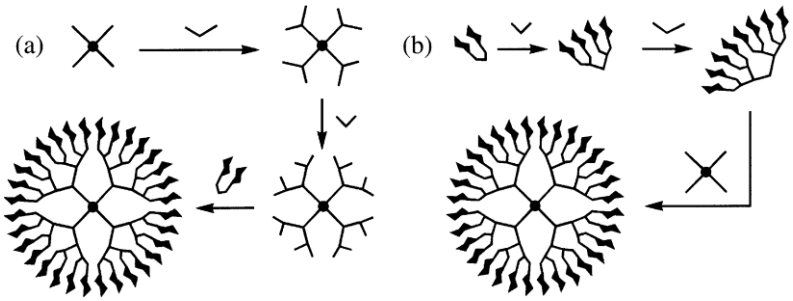


Figure 1-15 : Méthodes de synthèse des glycodendrimères par approche divergente (a) et convergente (b).

La méthode convergente implique peu d'étapes de synthèse et la production de glycodendrimères homogènes, cependant elle requière une quantité importante de sucre. La méthode divergente nécessite quant à elle de faire un grand nombre de réactions sur chaque molécule ce qui peut engendrer de la dispersion. Néanmoins, la modification, par la méthode divergente, de dendrimères commercialement disponibles semble être la méthode la plus simple et la plus couramment utilisée (Turnbull and Stoddart, 2002). Ainsi, deux principaux types de dendrimères sont disponibles commercialement, il s'agit du dendrimère polyamidoamine (PAMAM) et du dendrimère poly(propylène imine) (Astramol^{TM}). De nombreuses études utilisent ces types de dendrimères pour les fonctionnaliser avec des sucres et étudier les interactions protéine/sucre (Baek and Roy, 2002; Vrasidas et al., 2001; Woller and Cloninger, 2002, 2001). Il a notamment été montré qu'un dendrimère type PAMAM de 6ème génération fonctionnalisé avec 172 mannoses présente une activité par sucre supérieure de deux ordres de grandeur par rapport au monomère vis-à-vis de la lectine ConA. De plus, il existe d'autres synthèses de dendrimères comme celles partant d'un cœur central type sucre comme la cyclodextrine ou type peptidique (Darbre and Reymond, 2008; Kadam et al., 2013a; Kolomiets et al., 2009; Vargas-Berenguel et al., 2002). Ces dendrimères présentent l'avantage d'être naturels et biocompatibles.

1.3.3.3. Les glyconanoparticules

Les glyconanoparticules sont des nanoparticules, en général métalliques, sur lesquelles sont greffés des sucres. Les glyconanoparticules offrent la possibilité de greffer différents types de sucres sur une même particule ainsi que d'autres molécules comme des peptides, de l'ADN, des sondes luminescentes,… Les nanoparticules possèdent un cœur qui peut avoir différentes propriétés physiques (magnétique, fluorescente,…). Elles permettent donc la présentation multivalente de sucres ainsi que des applications en imagerie (Marradi et al., 2013). Les premières glyconanoparticules ont été synthétisées en 2001. Il s'agissait de nanoparticules d'or sur lesquelles étaient greffés soit du lactose soit du Lewis^{X}. Elles visaient à mimer le glycocalix (Barrientos et al., 2003; de La Fuente et al., 2001). Depuis, de nombreuses glyconanoparticules ont été synthétisées et étudiées pour leur interaction avec des lectines. Ces glyconanoparticules permettent la présentation d'un très grand nombre de sucres sur une toute petite surface (en générale sphérique) ce qui permet d'augmenter l'interaction avec la lectine grâce à un effet cluster (Yilmaz and Becer, 2015). De plus, les glyconanoparticules apparaissent comme un bon modèle biomimétique permettant d'intervenir dans les processus biologiques mettant en jeu des sucres. En effet, les glyconanoparticules sont, en général, dispersées dans les conditions physiologiques, résistantes à la dégradation enzymatique et non-toxiques. Il a notamment été montré que les glyconanoparticules capables de mimer le glycocalix pouvaient être utilisées pour leur propriété anti-adhésive afin d'empêcher l'adhésion des cellules tumorales circulantes (métastases) sur de nouvelles cellules épithéliales saines (de La Fuente and Penadés, 2006; Rojo et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que des nanoparticules fonctionnalisées avec des clusters de mannoses ont un effet inhibiteur de l'adhésion engendrée par les *pili* de type I de *E. coli* ainsi que dans la formation de son biofilm (Khanal et al., 2015). Enfin, une étude a montré qu'utiliser des glyconanoparticules chargées négativement et greffées avec le Glyco-peptide gp120 V3 permettaient d'obtenir une bonne structure secondaire de celui-ci. Le peptide gp120 V3 est un peptide présent sur la membrane du VIH-1 et qui est très immunogénique. En effet, des anticorps ciblant ce peptide sont présents chez quasiment toutes les personnes infectées par le VIH-1. Il a été montré, chez le lapin, que ce type de glyconanoparticules étaient capables de promouvoir la production d'anticorps anti-gp120 V3 ce qui offre des perspectives de développement d'un vaccin (Gianvincenzo et al., 2015). Néanmoins, il est important de souligner que des progrès restent à faire dans le contrôle de la synthèse des glyconanoparticules afin d'obtenir de façon précise différentes densités et compositions en sucres (Yilmaz and Becer, 2015).

1.3.3.4. Les glycoclusters

Les glycoclusters sont de plus petites molécules par rapport aux autres types de ligands multivalents présentés précédemment et ne présentent pas de motifs de répétition. Les glycoclusters sont construits à partir d'un échaffaudage (cœur) de différents types (calixarènes, peptides cycliques, sucres, composés aliphatiques,…) sur lequel sont branchés des bras se terminant par un sucre. La géométrie du cœur, la valence et la composition du bras (nature et longueur) permettent d'obtenir différentes topologies de glycoclusters et différentes propriétés. Depuis les années 80s, de nombreuses synthèses de glycoclusters ont été développées permettant une grande diversité de structures pouvant cibler des virus, des bactéries, des métastases,… à des fins thérapeutiques (Cecioni et al., 2015; Chabre and Roy, 2010; Deniaud et al., 2011; Imberty et al., 2008; Roy, 1996; Wittmann and Pieters, 2013). Il a notamment été synthétisé des glycoclusters ciblant les hémagglutinines présentes sur le virus de la grippe Influenza afin de bloquer son adhésion aux cellules de l'hôte (Marra et al., 2008; Sabesan et al., 1992). Des glycoclusters ont également été synthétisés pour cibler des lectines bactériennes comme FimH présente chez les bactéries *E. coli* causant des infections de l'appareil urinaire ou les toxines Shiga présentes chez *S. dysenteria* et *E. coli* enterohémorragique causant de graves diarrhées (cf. 1.3.2.2) (Almant et al., 2011; Cecioni et al., 2015; Gouin et al., 2009; Konig et al., 1998; Nierengarten et al., 2013).

1.3.3.5. Les ligands multivalents ciblant les lectines de PA

- Vue d'ensemble

Aucune molécule multivalente ciblant CupB6, PilA, PilY1, FliD ou encore FliC n'est rapportée dans la littérature. En revanche, de nombreux ligands multivalents ont été synthétisés pour cibler les lectines PA-IL et PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* que ce soit des dendrimères, des glyconanoparticules ou encore des glycoclusters (Andreini et al., 2010; Boukerb et al., 2014; Buffet et al., 2015; Casoni et al., 2014; Caumes et al., 2015; Cecioni et al., 2012, 2011a, 2011b, 2009; Gening et al., 2013; Gerland et al., 2014; Johansson et al., 2011; Ligeour et al., 2015b; Marotte et al., 2007b; Pertici et al., 2013). Parmi ceux-ci, certains ont été testés pour leur activité inhibitrice de la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Reymond *et al.* ont notamment synthétisé des glycodendrimères peptidiques, ciblant respectivement les lectines PA-IL et PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* avec des affinités de l'ordre du nM et permettant l'inhibition de la formation du biofilm ainsi que la dispersion d'un biofilm déjà établi (Bergmann et al., 2016; Johansson et al., 2008; Kadam et al., 2011; Reymond et al., 2013). Des glycoclusters ciblant PA-IL et PA-IIL ont également été

testés pour leur activité inhibitrice de l'agrégation des bactéries, de la formation du biofilm et de l'adhésion aux cellules pulmonaires. Il a notamment été montré que des glycoclusters tétravalents ayant un cœur calix[4]arène et fonctionnalisés avec soit du fucose (fucoclusters) soit du galactose (galactoclusters) (Figure 1-16a) étaient capables d'inhiber (à 250 µM), respectivement, de 90 % et 70 % l'adhésion de PA aux cellules épithéliales pulmonaires et de diminuer (à 5 mM) la biomasse du biofilm de PA (Boukerb et al., 2014). D'autres glycoclusters tétravalents ayant un cœur mannose fonctionnalisé avec un bras aromatique et du galactose (Figure 1-16b) ont montré qu'ils pouvaient diminuer le biofilm de PA de 40 % dès 5 µM pour le plus actif (Ligeour et al., 2014).

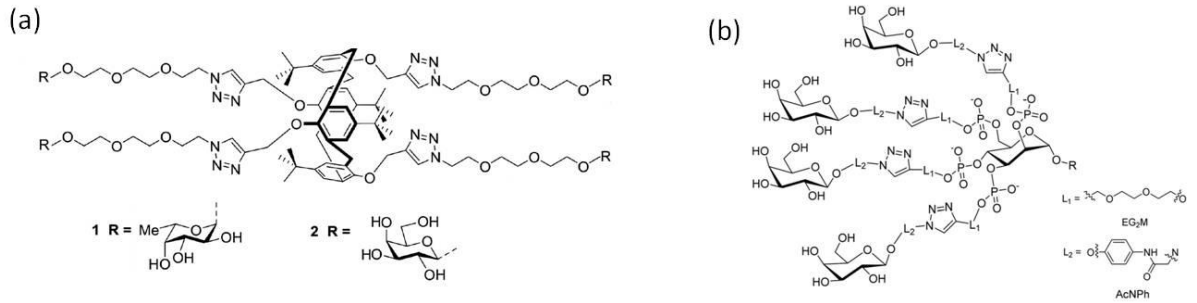


Figure 1-16 : Structure de glycoclusters à cœur calix[4]arène (a) et à cœur mannose (b) capables de déstabiliser le biofilm de Pseudomonas aeruginosa (Boukerb et al., 2014; Ligeour et al., 2015b).

Le tableau 1-2 et tableau 1-3 présentent une liste non exhaustive des ligands multivalents ciblant, respectivement, les lectines PA-IL et PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa*. Ils permettent d'avoir une vue d'ensemble des ligands multivalents interagissant avec une bonne affinité avec ces deux lectines. Autant que faire se peut, cette liste exposera les constantes de dissociation K_d de ces ligands vis-à-vis de la lectine ciblée calculées par ITC. Les IC_{50} exposés seront ceux obtenus selon des méthodes identiques. En effet, selon la technique et les conditions expérimentales utilisées, des disparités dans l'effet chélate obtenu pour une même interaction peuvent être observées (cf. Chap. 3). Pour chaque ligands multivalents, leur affinité vis-à-vis de PA-IL ou PA-IIL est comparée respectivement à celle du sucre monovalent, galactose ou fucose. Le facteur d'amélioration β reflète le gain d'affinité par rapport au sucre monovalent.

		Valence	K_d (nM) / ITC	β	Réf.
	D-Galactose	1	87 500	1	(Kadam et al., 2011)
Glyco-dendrimères	Glycopeptide dendrimère aliphatique	4	400	219	
	Glycopeptide dendrimère aromatique	4	100	875	
	Dendrimère à base de trismesylchoride (bras aromatique)	9	230	380	(Chabre et al., 2011)
GlycoNano-Particules (GNP)	GNP-3 : densité de Galactoses 33%	15	760	115	(Reynolds et al., 2012)
	GNP-6 : densité de Galactoses 100%	67	50	1750	
Glycoclusters	Calix[4]arène (3:1)	4	200	437	(Cecioni et al., 2009)
	Calix[4]arène (2:2)	4	176	497	
	Peptidoïde linéaire	4	1800	48.6	(Cecioni et al., 2011a)
	Peptidoïde cyclique	4	300	292	
	Porphyrine	4	330	265	
	Calix[6]arène	6	140	625	
	Calix[4]arène (2:2) aromatique	4	90	972	(Cecioni et al., 2012)
	Cyclotetrasaccharides	2	220	398	(Gening et al., 2013)
	Cyclotetrasaccharides	4	79	1108	
	Cœur mannose avec linker rigide	4	194	451	(Ligeour et al., 2015b)
	Cœur mannose avec linker flexible	4	157	557	
	Cœur linéaire de triglucose-triazole	2	28	312	(Pertici et al., 2013)
	Peptidoïde linéaire thioglycoside	4	214	409	(Caumes et al., 2015)
	Peptidoïde cyclique thioglycoside	4	97	902	

Tableau 1-2 : Principaux ligands multivalents ciblant PA-IL classés par famille et caractérisés par leur constante de dissociation déterminée par ITC. Le facteur d'amélioration β (cf. 1.3.2.4) décrit l'amélioration d'affinité par rapport au galactose.

		Valence	K_d (nM) / ITC		IC_{50} (nM) / ELLA	Réf.
Glyco-dendrimères	α-L-Fucose	1	/	/	11 000	(Johansson et al., 2008)
	Glycopeptide dendrimère	4	/	/	140	
	Glycopeptide dendrimère	4	/	/	660	(Johansson et al., 2011)
	Glycopeptide dendrimère	8	/	/	25	(Kolomiets et al., 2009)
	α-Me-fucoside	1	430	1	620	(Berthet et al., 2013)
	Glycocyclopeptide dendrimère	16	28	15	0.6	
Glycoclusters	calix[4]arène (2:2)	4	48	8.9	/	(Boukerb et al., 2014)
	Bras à greffé au cœur n°11	2	43	10	/	(Buffet et al., 2015)
	Fullerène	24	23	19	/	
	LewisA (Le^a)	1	210	1	/	(Marotte et al., 2007b)
	Oligoéthylène glycol	2	90	2.3	/	(Marotte et al., 2007a)

Tableau 1-3 : Principaux ligands multivalents ciblant PA-IIL classés par famille et caractérisés par leur K_d déterminée par ITC ou leur IC_{50} déterminée par ELLA. Le facteur d'amélioration β (cf. 1.3.2.4) décrit l'amélioration d'affinité par rapport au fucose.

Cette liste non exhaustive montre que la synthèse de ligands multivalents permet d'atteindre des affinités de l'ordre du nM pour les lectines PA-IL et PA-IIL.

De manière générale, la synthèse d'un ligand multivalent permettant une interaction optimale avec la lectine prend en compte plusieurs paramètres comme :

- la valence du ligand,
- l'orientation dans l'espace des bras portant le sucre,
- l'optimisation de la distance entre les différents sucres,
- l'introduction de flexibilité,
- l'introduction de différentes fonctions chimiques pour créer des interactions supplémentaires avec la lectine (liaison hydrogène, π-π stacking, interaction hydrophobe, ionique, …).

- <u>Les paramètres importants régissant l'interaction avec PA-IL</u>

Pour PA-IL, un effet chélate est clairement mis en jeu lors de l'interaction avec des ligands multivalents présentant plusieurs galactoses. En effet, une augmentation d'affinité d'un facteur 100 à 1000 est observée par rapport au D-Galactose signifiant qu'au moins deux

galactoses du ligand multivalent interagissent avec un tétramère de PA-IL. Reynolds *et al.* ont synthétisé des glyconanoparticules d'or (GNP) fonctionnalisées avec différentes densités de galactoses. Ils ont montré que l'augmentation de la densité en galactoses permettait d'augmenter l'interaction avec PA-IL jusqu'à un plateau où même en augmentant la densité en galactoses, l'affinité reste la même. Des mesures ITC ont montré qu'avec une faible et moyenne densité en galactoses, l'interaction avec PA-IL est majoritairement favorisée par la contribution enthalpique alors qu'à forte densité, elle est aussi favorisée par un faible coût entropique. L'augmentation de la densité permet d'une part une plus forte probabilité d'avoir une distance inter-galactoses permettant un effet chélate et d'autre part favorise la réassociation statistique (Reynolds et al., 2012).

Que ce soit pour des glycodendrimères ou des glycoclusters ciblant PA-IL, l'augmentation de la valence en galactose a aussi permis d'augmenter l'interaction avec PA-IL. De plus, la topologie et la nature des bras portant le sucre permet aussi d'augmenter l'interaction. Cecioni *et al.* ont notamment étudié différents glycoclusters tétravalents possédant différents cœurs (peptidique linéaire, peptidoïque cyclique méthyle-glucoside, porphyrine, calixarène) et bras (flexible, rigide, hydrophile, hydrophobe). Il est ressorti que le calixarène 1,3 alterné (2:2) correspond à la meilleure topologie pour interagir avec PA-IL où deux bras sont présents de part et d'autre du cœur calixarène (Figure 1-16a). Il a été montré que l'interaction d'un tel glycocluster avec PA-IL était favorisée enthalpiquement et faiblement contrebalancée par un coût entropique, ce qui permet d'obtenir un effet chélate où deux galactoses du glycocluster interagissent simultanément avec deux sites sur un tétramère de PA-IL (Cecioni et al., 2011a, 2009). Concernant la nature des bras, ils ont montré qu'un bras plus court de type diéthylène glycol (EG_2) par rapport au triéthylène glycol (EG_3) augmentait légèrement la force d'interaction avec PA-IL (Cecioni et al., 2012). Reymond *et al.* ont également étudié l'influence de la nature du bras d'un glycodendrimère peptidique fonctionnalisé avec des galactoses pour interagir avec PA-IL. Ils ont montré qu'un bras comportant un phényle permettait une meilleure interaction avec PA-IL comparé à un bras avec un éthyle. La résolution aux rayons X du cristal du complexe PA-IL avec le glycodendrimère aromatique a montré que le phényle engendrait une interaction supplémentaire type π-π stacking avec le résidu His50 de PA-IL. De plus, il a été montré qu'une partie de la séquence peptidique (tripeptide : Lys-Pro-Leu) du glycodendrimère avait des points de contact avec la boucle Asp47-Gln53 de PA-IL. L'optimisation de cette séquence a permis d'accroitre l'affinité de ce ligand multivalent pour cibler PA-IL (Kadam et al., 2013a, 2011). Notre consortium s'est également intéressé à l'effet du cœur et de la nature du bras du glycocluster pour interagir

avec PA-IL. On a notamment étudié l'effet de la longueur du bras, de la rigidité, de la charge et de la position de l'aglycone aromatique. Parmi les différents cœurs testés (linéaire : 1, 4 Dimethylcyclohexane (DMCH) ; centré : Man, Gal et Glc), le mannose offre la meilleure topologie pour interagir avec la lectine PA-IL. De plus, la combinaison d'un bras flexible (EG_2) avec un aglycone aromatique phényle a également permis une bonne interaction avec PA-IL. La position du groupement aromatique joue aussi un rôle important dans l'interaction. En effet, un glycocluster comportant une thymine directement reliée au C1 du galactose (T-Gal) ne présente pas d'affinité par PA-IL comparé au glycocluster comportant le bras Ph-O-Gal (Gerland et al., 2014).

Tous ces ligands multivalents ont été fonctionnalisés avec du galactose et ont montré l'importance de la topologie et surtout de la nature du bras pour pouvoir faire des interactions supplémentaires avec la lectine. C'est pourquoi, lors de ma thèse il a été investigué l'effet de fonctionnaliser des glycoclusters avec différents oligosaccharides pour cibler PA-IL ainsi que l'étude de différents bras comportant des groupements aromatiques. Il a aussi été étudié l'effet de l'apport de groupements thiol dans la structure du glycocluster afin de le rendre plus affin pour PA-IL mais également plus résistant à la dégradation enzymatique en vue d'un développement thérapeutique.

- <u>Les paramètres importants régissant l'interaction avec PA-IIL</u>

En comparant, les mesures de K_d effectuées par ITC pour PA-IIL, les augmentations d'affinité des ligands multivalents par rapport au ligand monovalent sont plus faibles (Tableau 1-3). Ceci peut être expliqué par plusieurs raisons. Premièrement, le L-Fucose montre déjà une forte affinité pour PA-IIL grâce à la présence de deux atomes de Ca^{2+} dans la poche de reconnaissance du fucose présente sur PA-IIL. Deuxièmement, les deux sites d'interaction avec le fucose les plus proches sont situés sur des faces opposées de PA-IIL imposant au ligand multivalent une grande distance et une forte torsion afin d'atteindre les deux sites simultanément. Comparé à PA-IL, l'effet de la topologie du ligand multivalent pour interagir avec PA-IIL semble être moins important. Néanmoins, Reymond *et al.* ont reporté la synthèse d'une bibliothèque de glycodendrimères peptidiques tétravalents et fonctionnalisés avec du fucose. L'un de ces glycodendrimères présente un fort potentiel d'interaction avec PA-IL ainsi que d'inhibition de la formation du biofilm. La structure cristalline de ce glycodendrimère n'a pu être obtenue. Cependant la structure cristalline du bras monomérique composé d'un linker tripeptidique (Lys-Pro-Leu) rattaché au fucose a montré que la chaine latérale du résidu Asn70 de PA-IIL rentrait en contact avec le tripeptide, permettant ainsi de renforcer

l'interaction (réf. PDB : 3DCQ). De plus, la modélisation du glycodendrimère en interaction avec PA-IIL a clairement montré que deux fucoses du ligand ne pouvaient pas lier simultanément deux sites de liaisons sur PA-IIL. Cependant, ce glycodendrimère permettrait la formation d'agrégat grâce à des interactions intermoléculaires entre plusieurs glycodendrimères et plusieurs lectines PA-IIL (Johansson et al., 2011, 2008; Kolomiets et al., 2009). Ce phénomène d'agrégation a aussi été observé par d'autres groupes avec d'autres ligands multivalents (Berthet et al., 2013; Deguise et al., 2007). Nous avons également synthétisé une bibliothèque de glycoclusters fonctionnalisés avec du fucose afin d'interagir avec PA-IIL avec lesquels aucun effet cluster n'a pu être observé. Cependant, il apparait que l'utilisation d'un cœur type mannose avec un bras flexible améliore l'interaction avec PA-IIL (Gerland et al., 2012; Morvan et al., 2007). Enfin des glycoclusters di et trivalents fonctionnalisés avec le disaccharide Fucα1-4GlcNAc, qui est un motif présent dans les sucres de type Lewis^{A} ont également été synthétisés et ont aussi permis d'obtenir un effet agrégatif pour les structures divalentes mais pas d'effet chélate (Marotte et al., 2007a).

A l'exception d'un ligand multivalent où les données ITC et de modélisation moléculaire ont suggéré un effet chelate agrégatif, aucun effet chélate n'a pu à ce jour être observé pour des ligands multivalents ciblant PA-IIL (Berthet et al., 2013). Néanmoins, la multivalence a permis d'obtenir des effets agrégatifs. Le choix des linkers semble aussi pouvoir renforcer l'interaction du fucose avec PA-IIL. Par exemple, dans le cas de la bibliothèque de glycodendrimères peptidiques synthétisée par Reymond *et al.*, il a été montré que leur potentiel d'interaction avec PA-IIL était séquence dépendant et que le tripeptide rattaché au meilleur des glycodendrimères pouvait interagir avec l'Asn70 de PA-IIL. Mis à part le disaccharide dérivant du sucre type Lewis^{A}, aucun sucre n'a été monté sur plateforme pour tester son interaction avec PA-IIL. La fonctionnalisation de glycoclusters avec des oligosaccharides semble donc être une piste pour améliorer l'interaction avec PA-IIL, cette piste sera notamment explorée pendant ma thèse ainsi que l'effet de la topologie des glycoclusters.

1.4. La caractérisation des interactions protéine/ligand

Plusieurs méthodes, qui peuvent être qualitatives, semi-quantitatives ou quantitatives, existent pour caractériser les interactions protéine/ligand. Il sera présenté dans un premier temps les méthodes les plus couramment utilisées pour caractériser les interactions lectine/sucre avant de se focaliser sur les biopuces et plus particulièrement les glycoarrays. Cet outil de criblage

est au centre de mon travail de thèse et c'est sur lequel des développements méthodologiques ont été effectués. Toutes ces méthodes, à l'exception de l'ITC, mettent en jeu un système sur lequel est immobilisé une sonde (ici : sucre) susceptible d'interagir avec une cible présente dans le milieu (ici : lectine). Le système est alors capable de transformer cette interaction en un signal physique mesurable (optique, électrique, thermique, magnétique,…).

1.4.1. Les méthodes conventionnelles permettant l'analyse d'affinité

Les différentes méthodes exposées ici se font soit par mesure direct de l'interaction entre le sucre et la lectine, soit à travers un test de compétition.

1.4.1.1. L'inhibition d'hémagglutination (HIA)

La méthode d'inhibition d'hémagglutination (HIA) fut mise au point au début des années 1940, lorsqu'on remarqua que des particules du virus de la grippe Influenza entrainaient l'agglutination des érythrocytes. Cette agglutination pouvait ensuite être inhibée par l'ajout d'anticorps dirigés contre les particules virales (Hirst, 1942, 1941). Cette méthode repose donc sur le fait que les globules rouges (érythrocytes) présentent plusieurs motifs saccharidiques (sucres) à leur surface capables d'interagir avec une lectine ce qui va entrainer leur hémagglutination. Cette méthode permet de se rendre compte de l'activité de la lectine et de calculer la concentration minimale en lectine nécessaire pour hemagglutiner les érythrocytes. De plus, elle permet pour un ligand capable d'entrer en compétition avec les sucres présents sur l'érythrocyte, d'évaluer son potentiel d'inhibition d'hémagglutination des érythrocytes par la lectine. On peut ainsi calculer la concentration minimale d'inhibition (MIC) qui correspond à la concentration minimale de ligand nécessaire pour inhiber l'hémagglutination des érythrocytes (Figure 1-17). Cette technique présente l'avantage d'être peu onéreuse et facile à mettre en œuvre puisque la détection du signal est visuelle et ne nécessite pas d'appareillage. Cependant, la lecture du signal est fortement dépendante de l'expérimentateur ce qui peut induire des biais dans l'interprétation des résultats. De plus, les valeurs de MIC sont semi-quantitatives et peuvent grandement varier avec, notamment, le lot d'érythrocytes utilisé. Enfin, il s'agit de mesures faites avec des concentrations discrètes, la précision sur la MIC est donc dépendante de l'écart entre deux concentrations.

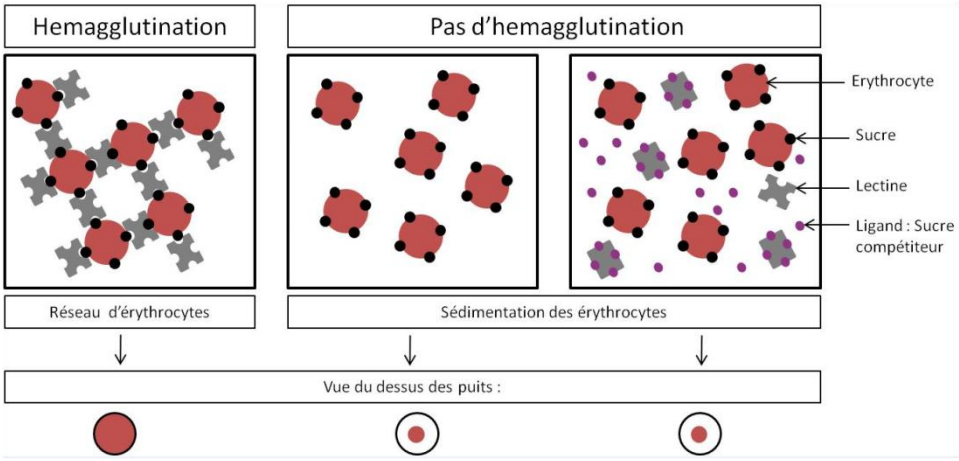


Figure 1-17 : Principe de fonctionnement de la méthode d'inhibition d'hémagglutination (HIA).

1.4.1.2. L'Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

La méthode Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) fait référence à la méthode ELISA pour un système sucre/lectine au lieu d'un système anticorps/antigène. Il s'agit d'immobiliser le plus souvent par adsorption un polymère présentant plusieurs sucres puis d'ajouter une lectine conjuguée à une enzyme comme la HRP (HorseRadish Peroxidase). Le substrat de l'enzyme est ensuite ajouté et transformé en un produit produisant un signal optique mesurable grâce à un spectrophotomètre. Ce signal est proportionnel à la quantité de lectine liée au sucre immobilisé. Cette méthode est aussi utilisée pour calculer le potentiel inhibiteur d'un ligand capable de rentrer en compétition avec le sucre immobilisé pour lier la lectine. En ajoutant une concentration croissante de ce ligand, on peut déterminer la valeur d'IC_{50} qui correspond à la concentration de ligand nécessaire pour inhiber 50 % de l'interaction entre le sucre immobilisé et la lectine. Ainsi, plus le ligand sera affin pour la lectine, plus la valeur d'IC_{50} sera faible (Figure 1-18). L'obtention de cette valeur nécessite un ajustement de courbe dont la qualité dépend du nombre de points vers la zone du point d'inhibition à 50 % et du nombre de point dans les zones plateaux. De plus, l'abscisse étant en échelle logarithmique, une faible variation de la courbe d'ajustement entraîne de forte variation d'IC_{50}. Bien que plus robuste que le MIC, cette technique est semi-quantitative et peu discriminante devant conduire à une certaine prudence pour des molécules ayant des affinités proches. Ces valeurs d'IC_{50} peuvent fluctuer en fonction de la manière dont l'expérience est réalisée (système de révélation : enzyme, biotine … ; la concentration en lectine et en sucre ; …) et nous le verrons par ailleurs, elles sont dépendantes de la densité de surface en sucre immobilisé (cf. Chap. 3). De plus, cette technique nécessite une quantité non négligeable de matériel (de l'ordre du µmole) puisqu'elle est le plus souvent, réalisée en microplaque de 96 puits et en triplicat pour une

même condition expérimentale. Enfin, la lectine utilisée avec cette méthode doit être fonctionnalisée avec une enzyme, une biotine ou autre ce qui peut affecter son activité.

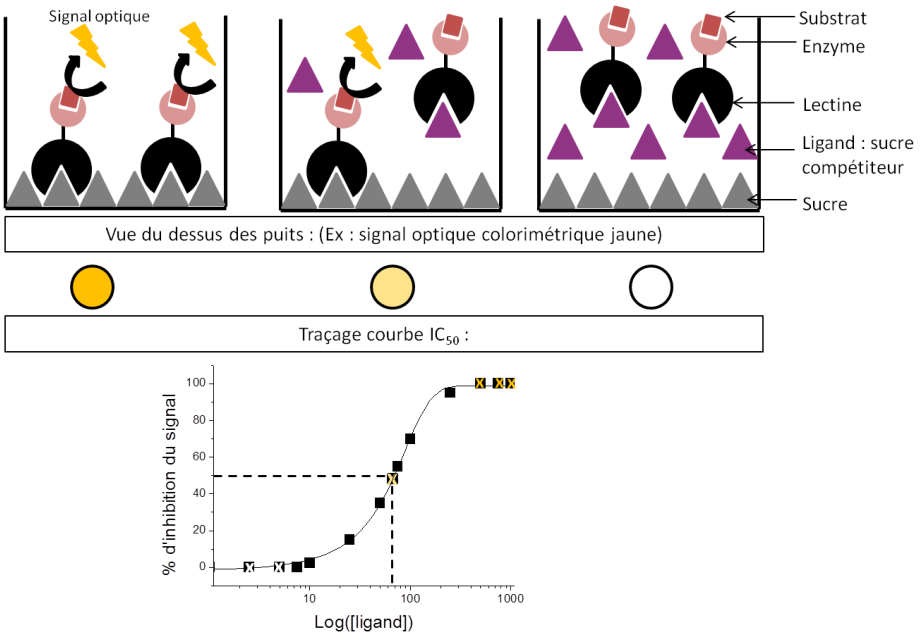


Figure 1-18 : Représentation schématique de la méthode Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) permettant la mesure d'IC_{50}.

D'autres méthodes permettent de mesurer directement les constantes d'association des interactions sucre/lectine comme la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) et la Microcalorimétrie de Titration Isotherme (ITC).

1.4.1.3. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Le phénomène de résonance plasmonique de surface fut observé pour la première fois en 1902 et utilisé pour étudier les interactions de biomolécules dès 1983 (Liedberg et al., 1983; Wood, 1902). De manière générale, lorsqu'un faisceau lumineux polarisé et monochromatique se trouve à une interface entre deux milieux ayant des indices de réfraction différents, la lumière est en partie réfléchie et en partie réfractée. Pour un certain angle d'incidence du faisceau lumineux, la lumière est totalement réfléchie. Le faisceau incident riche en photons peut alors entrer en résonance avec les électrons libres présents à l'interface. Les surfaces métalliques telles que l'or ou l'argent sont riches en électrons libres, un phénomène de résonnance appelé résonance plasmonique de surface (SPR) va se produire. La lumière réfléchie possède une intensité traduite en signal électrique par le détecteur. Lorsque la lumière incidente possède un angle permettant de rentrer en résonance avec les électrons de la surface, une baisse d'intensité de la lumière réfléchie est mesurée. L'angle de la lumière incidente à laquelle la résonance plasmonique de surface se produit dépend de l'indice de

réfraction de la surface. Ainsi si une biomolécule se fixe sur la surface, il se produit un changement d'indice et donc d'angle pour lequel le phénomène de résonance plasmonique de surface se produit (Figure 1-19).

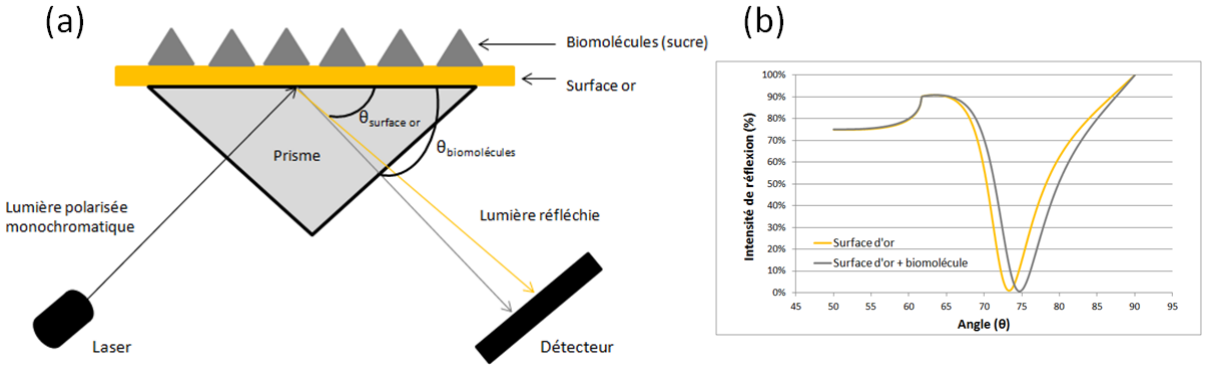


Figure 1-19 : Représentation schématique du fonctionnement de la technique résonance plasmonique de surface (SPR) (a) et de la réponse détectée par le détecteur (b).

Les appareils de SPR sont en général constitués d'une cellule de mesure comprenant une surface d'or fonctionnalisée avec une biomolécule (ici : sucre) et placée dans une chambre microfluidique permettant la circulation d'autres biomolécules (ici : lectine et/ou sucre compétiteur) et d'un détecteur permettant de mesurer l'intensité de la lumière réfléchie. Ce type d'appareillage permet donc de mesurer en temps réel, les réponses SPR dues à l'interaction sucre/lectine et de tracer un sensogramme. Le sensogramme est obtenu en enregistrant le signal SPR de l'interaction de la lectine avec le sucre immobilisé au cours du temps. Pour cela, une concentration croissante de lectine est injectée dans la chambre microfluidique jusqu'à atteindre l'équilibre de l'interaction puis l'injection est stoppée pour laisser la lectine se dissocier du sucre immobilisé. Ce type d'expérience donne accès, grâce à des modèles théoriques d'interactions, aux constantes cinétiques d'association et de dissociation, k_{on} et k_{off} et ainsi à la constante d'équilibre de dissociation K_d. Enfin, en injectant une quantité constante de lectine et croissante d'un ligand compétiteur au sucre immobilisé pour lier la lectine, une valeur d'IC_{50} peut aussi être calculée avec cette méthode. La méthode SPR présente plusieurs avantages comme le fait de pouvoir mesurer des interactions sucres/lectine en temps réel et non pas en point final après les lavages. De plus, cette méthode ne nécessite pas de fonctionnaliser la lectine avec un marqueur pour effectuer la détection ce qui permet de garder l'activité de la lectine intacte. Cependant, il est nécessaire de bien maîtriser la fonctionnalisation de la surface métallique avec le ligand que l'on souhaite analyser (sucre) tels que la densité de surface, interaction non spécifique,... afin d'obtenir une valeur de constante de dissociation robuste (Papalia et al., 2006; Zheng et al., 2015). L'obtention de valeurs de K_d faible requiert de ne pas être limité par le transfert de

masse et cette technique est moins sensible que la fluorescence par exemple. Enfin, dans le cas des études des interactions multivalentes, il est nécessaire de choisir le modèle approprié pour ajuster les sensogrammes et quantifier l'interaction multivalente.

1.4.1.4. La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC)

La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) est une méthode qui donne accès à des informations thermodynamiques telles que la détermination de l'enthalpie (ΔH), la stœchiométrie (n) et la constante d'équilibre d'affinité (K_a) de la réaction (Freire et al., 1990) et *in fine* le ΔS. La réalisation d'une expérience ITC nécessite d'avoir un microcalorimètre qui est composé de deux cellules et dont le principe est basé sur la régulation de la température entre ces deux cellules (Figure 1-20a). La première cellule est une cellule de référence remplie de tampon et la deuxième cellule contient la lectine en solution et est reliée à une seringue d'injection contenant le ligand à analyser. Plusieurs injections de ligand sont réalisées et pour chacune d'entre elles la puissance nécessaire à maintenir une température constante dans la cellule est mesurée. En effet, lors de l'injection du ligand, l'interaction avec la lectine émet de la chaleur si la réaction est exothermique ou en absorbe si la réaction est endothermique. Pour chaque expérience, un thermogramme est tracé correspondant à la puissance nécessaire à maintenir une température constante pour chaque injection en fonction du temps (Figure 1-20b). De ce thermogramme, est déduite une courbe d'isotherme d'association qui est ajustée à un modèle théorique d'interaction afin de déterminer l'enthalpie (ΔH), la stœchiométrie (n) et la constante d'équilibre d'affinité (K_a) de la réaction (Figure 1-20c).

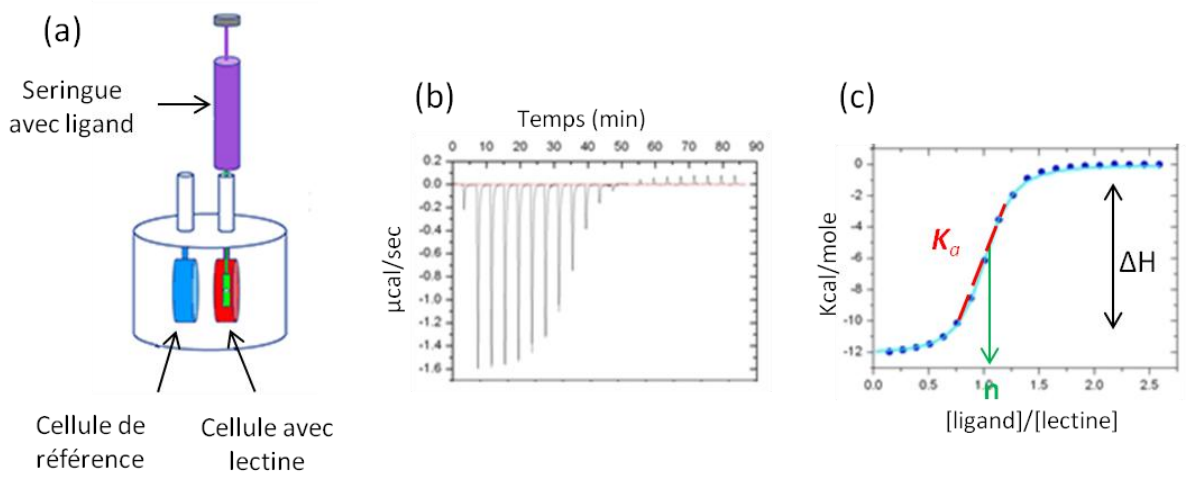


Figure 1-20 : Méthode de microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) avec une représentation schématique du microcalorimètre (a), d'un thermogramme (b) et d'une courbe d'isotherme d'association donnant accès au ΔH, K_a et n de l'association (c). Adapté de http://www.malvern.com.

L'ITC est la méthode de référence pour déterminer des données thermodynamiques, et la précision de celle-ci dépend principalement de l'allure de la sigmoïde obtenue (Dam and Brewer, 2002). Cette courbe sigmoïde est approximée grâce à un modèle théorique d'interaction ce qui signifie qu'il est nécessaire de connaitre les paramètres structuraux de la lectine afin de choisir le bon modèle. Enfin, l'inconvénient principal de cette technique est qu'elle nécessite une grande quantité de lectine et de ligand, de l'ordre du mg pour faire une expérience.

1.4.2. L'outil biopuce au service de l'étude des interactions sucre/lectine

1.4.2.1. Définition et application

La glycobiologie est la science qui étudie les rôles biologiques des sucres. Les principaux verrous technologiques dans le développement de cette science sont la grande diversité structurelle des sucres et la faible quantité de matériel biologique disponible. Pour pallier à ces verrous, le développement des biopuces à sucres (glycoarray) et à lectines depuis les années 2000s a permis de réaliser des analyses à haut débit des interactions sucre/protéine afin d'en comprendre les relations structure/affinité (Feizi et al., 2003; Fukui et al., 2002; Park and Shin, 2002; Willats et al., 2002). Le développement des glycoarrays a aussi bénéficié de l'expertise concernant les puces à ADN développées depuis le début des années 1990 (Blanchard and Hood, 1996; DeRisi et al., 1996; Mirzabekov, 1994; Schena et al., 1995; Souteyrand, 1999).

Le glycoarray repose sur l'immobilisation localisée et ordonnée de sucres (sondes) à la surface d'un support solide. Il présente l'avantage de pouvoir réaliser une analyse simultanée et en parallèle d'un grand nombre de sucres tout en utilisant de faible quantité de matériel biologique. Grâce à cet outil, il est obtenu, en peu de temps, un grand nombre de données sur les interactions sucre/protéine (sonde/cible) (Chevolot et al., 2007b; Park et al., 2013; Wang, 2003; Wu et al., 2009). Historiquement, les glycoarrays ont été construits en immobilisant des sucres simples. Cependant, l'interaction entre un sucre et une lectine est faible et est grandement augmentée grâce au « cluster glycoside effect » (cf. 1.3.2.3). Ces dernières années, un essor de la synthèse chimique de ligands multivalents a donc vu le jour (cf. 1.3.3). Néanmoins, l'analyse de l'affinité de tels ligands sur biopuce est encore peu développée. Tout de même, on peut citer l'équipe de Pieters *et al.* qui ont développé un microarray sur lequel sont immobilisés des glycodendrimères et qui est combiné à une cellule fluidique permettant la circulation de solutions contenant, par exemple, une lectine. Cette technique leur permet de

faire une analyse en temps réel des interactions entre des glycodendrimères fonctionnalisés avec du mannose et les lectines ConA et GNA (*Galanthus nivalis* agglutinine) afin d'obtenir les vitesses d'association et de dissociation du complexe (K_{on} et K_{off}). D'autres ont utilisé des microarrays sur lesquels sont immobilisés des glycopolymères ou des glycoprotéines de BSA fonctionnalisées avec des oligosaccharides (Godula et al., 2009; Narla and Sun, 2012; Oyelaran et al., 2009). Enfin, nous avons été les premiers à fabriquer des microarrays sur lesquels sont immobilisés des glycoclusters par hybridation d'ADN (DDI) (Chevolot et al., 2007a). Cette technique a ensuite été reprise par l'équipe de Winssinger pour l'analyse de ligands divalents ciblant PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa* (Novoa et al., 2014).

Cependant, l'une des limitations principales du glycoarray est que le signal émis ne dépend pas seulement de l'affinité entre la sonde (sucres simples ou multivalents) et la cible (lectine) mais aussi de la façon dont la sonde est immobilisée (densité, orientation, ...). Toutefois, des protocoles précis utilisant la fluorescence et l'imagerie SPR (SPRi) ont été développés et permettent d'obtenir des données semi-quantitatives à quantitatives (IC_{50} et K_d) avec un glycoarray.

Les applications des glycoarrays sont multiples, elles peuvent être l'étude des relations structure/affinité entre un sucre ou un ligand multivalent et une lectine (ou un anticorps) ainsi que la découverte de nouveaux ligands pour une protéine donnée (Fukui et al., 2002; Park and Shin, 2002; Stevens et al., 2006; Wang, 2003). Tout comme pour les protéines, le glycoarray peut être utilisé pour étudier des cellules entières (eucaryote, bactérie) et des virus afin de connaitre leur profil de reconnaissance de sucres (Heimburg-Molinaro et al., 2012). Le glycoarray peut également permettre de découvrir de nouvelles protéines capables d'interagir avec des sucres et faire des hypothèses concernant leur fonction biologique (Schallus et al., 2008). Le glycoarray peut aussi servir à doser l'activité de certaines enzymes comme les glycosyltransferases (Park and Shin, 2007). Enfin le glycoarray peut être utilisé à des fins biomédicales comme pour la découverte et le design de médicaments, le diagnostic de certaines maladies ou encore le développement de vaccins (Ernst and Magnani, 2009; Seeberger and Werz, 2007; Shi et al., 2015).

1.4.2.2. La fabrication d'un glycoarray

La fabrication d'un glycoarray nécessite de se poser plusieurs questions comme quelles sont les sondes à immobiliser, sur quel support solide, comment les immobiliser et enfin comment détecter leur interaction avec une cible ? Ce sont des questions interdépendantes puisque, par

exemple, le mode de détection du signal d'interaction entre la sonde et la cible va déterminer le support solide à utiliser et inversement.

L'avantage des glycoarrays étant de pouvoir analyser un très grand nombre de système (sonde/cible) simultanément, il est nécessaire de disposer d'une bibliothèque de sucres à immobiliser contenant dans l'idéal une grande diversité de structures. Les sucres peuvent être issus de produits naturels ou obtenus à partir de synthèse chimique ou enzymatique (Feizi et al., 2003). Il n'est pas aisé de purifier et d'obtenir avec des rendements corrects des sucres naturels. De plus, la fonctionnalisation des sucres pour permettre leur immobilisation sur la surface est souvent nécessaire ce qui rend l'approche par synthèse chimique préférable. Enfin, l'utilisation de glycoarray fabriqué avec des ligands multivalents comme le glycocluster-microarray implique aussi une synthèse chimique de ces ligands.

Il est ensuite nécessaire de déposer les sondes sur le support du glycoarray pour les immobiliser. Pour cette étape, on utilise en général la technologie des spotters qui permet de projeter quelques nL à quelques pL de sondes de manière localisée et ordonnée sur la surface. L'immobilisation peut se faire sur différents supports comme le verre, l'or ou des polymères et implique généralement un traitement chimique de la surface. L'immobilisation des sondes sur le glycoarray est un point clé dans la fabrication du glycoarray, elle peut se faire de manière covalente ou non et site-spécifique ou non. L'immobilisation de la sonde que ce soit des sucres simples ou des ligands multivalents sur le glycoarray doit répondre à plusieurs critères. Premièrement, il est nécessaire que la sonde soit immobilisée de façon robuste pour ne pas être éliminée pendant les lavages et reproductible pour obtenir des analyses fiables. Deuxièmement, l'immobilisation de la sonde doit être orientée afin que l'activité biologique de celle-ci soit maintenue sur le glycoarray et qu'elle soit accessible à la cible pour permettre l'interaction. Troisièmement, il est important de contrôler l'immobilisation de la sonde pour qu'elle soit immobilisée de façon homogène sur la surface avec une certaine densité. En effet, comme exposé précédemment les interactions sucre/lectine sont grandement favorisées par le « cluster glycoside effect », ainsi à forte densité d'immobilisation il peut se produire un effet cluster de surface où plusieurs sondes peuvent interagir simultanément avec une lectine. Ainsi pour un ligand multivalent, sa mesure d'affinité pour une lectine peut être biaisée par cet effet cluster de surface (Godula and Bertozzi, 2012; Wang et al., 2014; Yang et al., 2014). Ce phénomène sera exposé plus en détail dans le chapitre 3.

Le tableau 1-4 présentera les avantages et inconvénients de chaque type d'immobilisation ainsi que quelques exemples (Chevolot et al., 2007b; Park et al., 2013).

				Exemples			
		Avantages	**Inconvénients**	**Substrat**	**Traitement du substrat**	**Traitement de la sonde**	**Réf.**
NON-COVALENT	**NON-SPECIFIQUE**	- Simple - Pas de modification du sucre	- Immobilisation par interactions faibles - Sucre de grande taille type polysaccharide ou sucres simples rattachés à un porteur type BSA ou lipide	Verre	Nitrocellulose	/	(Fukui et al., 2002; Wang et al., 2002)
				Verre	Polystyrène noir oxydé	/	(Willats et al., 2002)
				Verre	Poly-L-Lysine	/	(Rogers et al., 2011; Shipp and Hsieh-Wilson, 2007; Shipp et al., 2008)
				Verre	Epoxyde ; Nitrocellulose ; PVDF ; Aluminium	BSA ou lipide	(Fukui et al., 2002; Zhang et al., 2010)
	SPECIFIQUE	- Immobilisation de sucre de petite taille type oligosaccharide - Immobilisation orientée du sucre	- Modification du sucre	Verre	Tag fluoré	Tag fluoré	(Chang et al., 2010; Chen and Pohl, 2008; Ko et al., 2005)
				Verre / Or	Streptavidine	Biotine	(Galanina et al., 2003; Godula and Bertozzi, 2010; Guo et al., 2004)
				Verre	ADN	ADN	(Chevolot et al., 2007a)
COVALENT	**NON-SPECIFIQUE**	- Pas de modification du sucre	- Ancrage réalisé sur n'importe quelle position du sucre - Possibilité de détruire la structure du sucre	Verre	Groupements photolabiles	/	(Angeloni et al., 2005; Pei et al., 2007; Wang et al., 2007)
				Verre	Acide boronique	/	(Hsiao et al., 2011)
	SPECIFIQUE	- Immobilisation orientée du sucre - Bras espaceur permettant une meilleure interaction sucre/lectine	- Modification de la surface et du sucre	Verre / Or	Thiol	Maléimide	(Park and Shin, 2002; Park et al., 2004)
				Verre	NHS-ester	Amine	(Blixt et al., 2004; Disney and Seeberger, 2004)
				Verre	Epoxyde	Hydrazide	(Lee and Shin, 2005; Park and Shin, 2007; Park et al., 2007; Tian et al., 2012)
				Verre / Or	Alkyne	Azide	(Godula et al., 2009; Huang et al., 2006; Michel and Ravoo, 2008)

Tableau 1-4 : Principales méthodes de greffage de ligands sur un glycoarray avec leurs avantages et inconvénients.

1.4.2.3. Les modes de détection de l'interaction sucre/lectine sur le glycoarray

Après avoir immobilisé les sondes (sucres) sur la surface, le support est mis en contact avec une solution contenant la cible c'est-à-dire une protéine capable de reconnaitre des sucres. Il faut donc ensuite être capable de détecter l'interaction et d'analyser le signal afin d'en déduire l'affinité de la protéine pour les sucres présents sur le glycoarray. Plusieurs méthodes de détection existent suivant le transducteur choisi c'est-à-dire la façon dont la reconnaissance entre deux espèces chimiques ou biologiques est transformée en un signal physique mesurable. Suivant le mode de détection choisi, celle-ci peut se faire avec ou sans marquage de la cible ainsi qu'en temps réel ou en point final de l'interaction. Parmi les méthodes de détections existantes, il a notamment été utilisé la radioactivité pour détecter l'activité d'une enzyme (glycosyltransferase) à incorporer des sucres radiomarqués sur un glycoarray (Pedersen et al., 2012; Shipp et al., 2008). D'autres groupes emploient l'électrochimie, la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge ou encore l'imagerie SPR afin de détecter l'affinité d'une protéine pour un ligand (de Boer et al., 2008; Dhayal and Ratner, 2009; Ding et al., 2008; Sanchez-Ruiz et al., 2011; Yang et al., 2014) (Tableau 1-5).

La fluorescence est la méthode de détection la plus couramment utilisée de part sa grande sensibilité et l'accès à des fluorophores et des scanners de fluorescence commerciaux. C'est cette technique de détection qui sera utilisée dans le cadre de cette thèse (Chevolot et al., 2007b; Velasco-Garcia, 2009). La fluorescence consiste en une émission d'un photon lors d'un retour à un état électronique stable d'une molécule préalablement excitée par l'adsorption d'un photon. L'utilisation de la fluorescence pour détecter une interaction biologique nécessite donc au préalable de marquer avec une molécule fluorescente la cible. Pour cela, plusieurs marqueurs sont commercialement disponibles. Chaque marqueur fluorescent est classé suivant deux longueurs d'onde : celle d'adsorption et celle d'émission. Afin de détecter le signal de fluorescence, il est le plus souvent utilisé un scanner de fluorescence. Les techniques utilisant la fluorescence comme signal de détection des interactions biologiques sont 10 à 1000 fois plus sensibles que celles utilisant la spectrophotométrie et permettent l'analyse simultanée d'un grand nombre de données par une lecture d'intensité de fluorescence. Cependant, il faut être averti du fait, que les marqueurs fluorescents ne sont pas toujours stables dans le temps et peuvent être perturbés par leur environnement comme les conditions de température et de pH (Marras et al., 2002). La lumière peut aussi fortement dégrader la structure du fluorophore jusqu'à empêcher son

émission de photons, c'est ce qu'on appelle le photoblanchiment. Enfin, le phénomène d'extinction ou quenching est aussi à l'origine d'une perte importante du signal de fluorescence. Ce phénomène a lieu lorsque deux fluorophores sont proches et lorsqu'il y a un recouvrement spectral entre le spectre d'émission du premier fluorophore et d'adsorption du deuxième. Ainsi les photons émis par le premier fluorophore sont réabsorbés par le second, le signal de fluorescence du premier fluorophore est alors fortement diminué (quenché) (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001).

Enfin, l'utilisation de groupements fluorescents permet d'étudier les interactions sucre/protéine par différentes méthodes de caractérisation une mesure d'intensité de fluorescence, d'IC_{50} et de K_d (Goudot et al., 2013; Kuno et al., 2005; Zhang et al., 2009a) (voir paragraphe 4.3.2).

Nom	Type de substrat nécessaire	Marqueur	Sensibilité
Fluorescence	Non réfléchissant	Oui	+++
Electrochimie	conducteur, ou semi-conducteur	Oui	+++
Radioactivité	Pas de contrainte	Oui	+++
Spectrométrie de masse	Pas de contrainte	Non	++
Spectroscopie infrarouge	Pas de contrainte	Non	++
Imagerie SPR	Métallique	Non	+

Tableau 1-5 : Les différentes caractéristiques des méthodes de détection de l'interaction sucre/lectine

1.4.3. Le glycocluster-microarray développé au laboratoire

Comme nous l'avons vu, il existe peu de microarray à glycocluster, bien que cet outil permet de cribler les interactions glycocluster/lectine (et donc notamment de PA) avec seulement quelques dizaines de picomoles de glycoclusters et de lectines. Il est ainsi possible de synthétiser un grand nombre de molécules avec des topologies, des valences et des propriétés variées.

1.4.3.1. La fabrication du glycocluster-microarray

Au laboratoire, nous disposons d'une bibliothèque de glycoclusters synthétisés par nos collègues de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier. Il s'agit de glycoclusters conjugués à une étiquette ADN et à un fluorophore (Cy3) dont la stratégie de synthèse est basée sur la chimie « Lego ». Les glycoclusters sont synthétisés sur support solide grâce à un synthétiseur d'ADN et à la réaction Huisgen catalysée par le cuivre

(CuAAC) ou « Click chemistry » (Morvan et al., 2007; Pourceau et al., 2008). La figure 1-21 donne une représentation générale de ces glycoclusters.

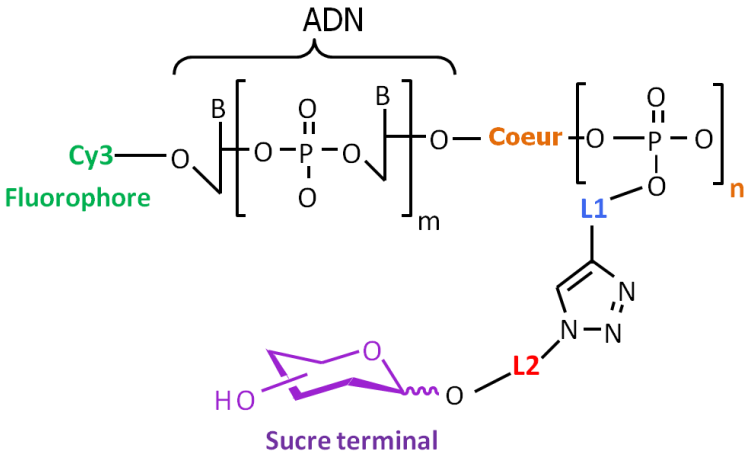


Figure 1-21 : Représentation schématique d'un glycocluster produit par les collaborateurs de l'IBMM de Montpellier.

De tels glycoclusters sont donc immobilisés sur le glycoarray grâce à l'hybridation d'ADN ou DDI (DNA-Directed Immobilization) (Chevolot et al., 2007a, 2011; Morvan et al., 2012; Niemeyer et al., 1999). Ce type d'immobilisation a été comparé à l'immobilisation covalente lors d'une étude menée en 2009 avec trois galactoclusters trivalents immobilisés de trois manières différentes et testés pour leur aptitude à interagir avec la lectine RCA_{120} conjugué au Cy5. Les galactoclusters étaient soit immobilisés de manière covalente via un bras espaceur (linker) court ou long, soit par DDI (Figure 1-22a). Les résultats ont clairement montré que l'immobilisation par DDI de 0.5 µM de glycoclusters permettait une meilleure reconnaissance avec la lectine tout en utilisant très peu de matériel biologique (Figure 1-22b) (Zhang et al., 2009a).

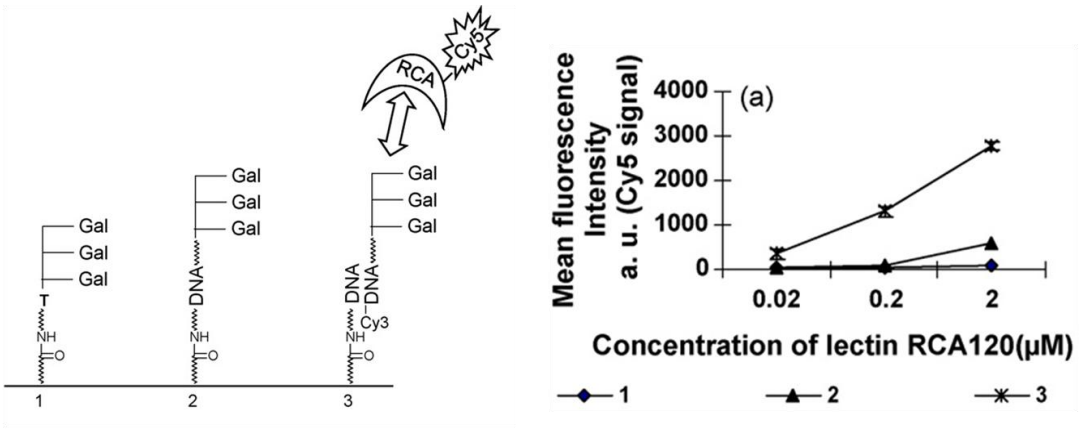


Figure 1-22 : Représentation schématique de l'immobilisation de trois glycoclusters (1, immobilisation covalente avec linker court ; 2, immobilisation covalente avec linker long et 3, immobilisation par DDI) (a) et mesure de leur interaction avec la lectine RCA_{20} pour une concentration d'immobilisation des glycoclusters de 0.5 µM (b) (Zhang et al., 2009a).

L'immobilisation par DDI présente aussi l'avantage de pouvoir réaliser une immobilisation orientée et multiplexée des glycoclusters. En effet, l'étiquette ADN permet d'éloigner le glycocluster de la surface pour améliorer l'interaction avec la lectine et permet également d'immobiliser différents glycoclusters sur une même surface grâce à l'utilisation de différents jeux de séquence ADN. De plus, chaque glycocluster présente un fluorophore, le Cy3, ce qui permet de contrôler l'immobilisation de celui-ci et de rendre compte de la densité relative en glycocluster. Il est important d'avoir accès à cette donnée puisque d'une part, l'intensité de fluorescence due au complexe glycocluster/lectine est proportionnelle à la densité de surface en glycocluster. D'autre part, l'effet cluster et donc la multivalence permet d'augmenter la force d'interaction entre le sucre et la lectine, ainsi contrôler la densité de surface en glycocluster permet de s'affranchir d'un effet cluster de surface et d'évaluer l'effet cluster seulement du au ligand multivalent.

Enfin, la mesure de l'interaction de la lectine avec le glycocluster se fait grâce à la mesure de fluorescence émise par l'Alexa647, fluorophore conjugué à la lectine. La figure 1-23 présente le principe de la reconnaissance glycocluster/lectine sur le glycoarray. Le fluorophore Alexa647 a notamment été choisi pour sa stabilité comparée au Cy5. Néanmoins, l'utilisation d'un marqueur fluorescent pour mesurer l'interaction entre le glycocluster et la lectine nécessite de conjuguer le marqueur (Alexa647) à la lectine. La conjugaison se fait sur les amines de la lectine. Le signal de fluorescence étant proportionnel à la quantité de fluorophore, il est nécessaire de maîtriser et contrôler le nombre de fluorophore par lectine et le nombre de lectines marquées d'un lot de marquage à l'autre.

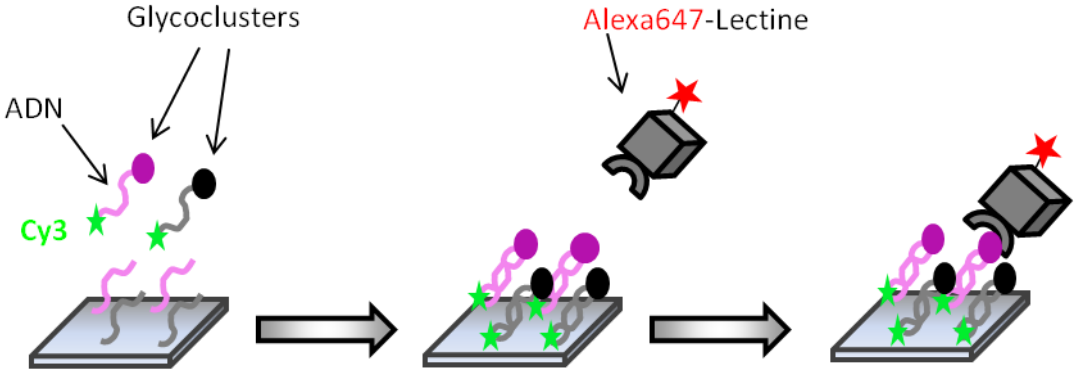


Figure 1-23 : Principe de fonctionnement du DDI glycocluster-microarray élaboré au laboratoire pour l'étude des interactions glycocluster/lectine.

1.4.3.2. Les mesures d'affinité avec le glycocluster-microarray

Le glycocluster-microarray permet de faire des analyses qualitatives et quantitatives des interactions glycocluster/lectine à travers des mesures d'intensités de fluorescence, de valeurs d'IC_{50} et de K_d tout en utilisant une très faible quantité de matériel (Figure 1-24) (Goudot et

al., 2013; Zhang et al., 2009a). Le maximum étant de 24 pmol de lectine pour une mesure de K_d.

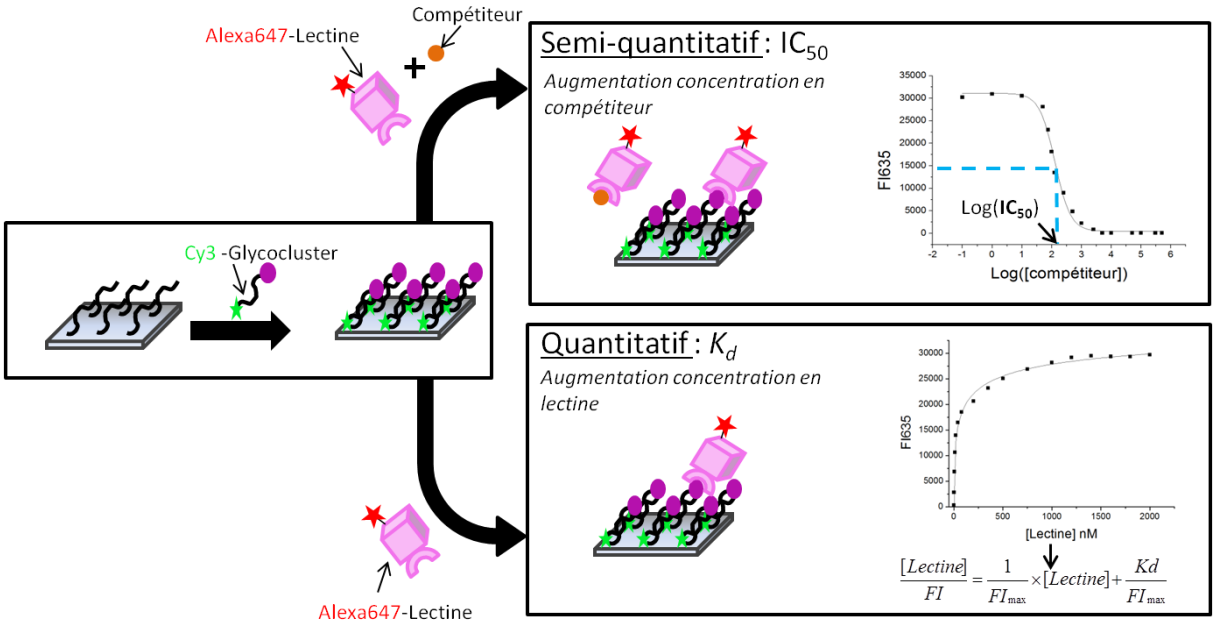


Figure 1-24 : Représentation schématique de la mesure d'IC_{50} et de K_d sur le glycocluster-microarray.

La mesure d'IC_{50} grâce au microarray fait intervenir un compétiteur capable d'entrer en compétition avec le glycocluster pour interagir avec la lectine. L'IC_{50} correspond à la concentration de compétiteur nécessaire pour inhiber 50 % du signal maximum de fluorescence du complexe lectine/glycocluster détecté sur le glycoarray. Ainsi, plus la valeur de l'IC_{50} est élevée, plus il faut une quantité importante de compétiteur pour déplacer l'interaction entre le glycocluster et la lectine et donc plus celle-ci est forte.

En 2005, Kuno *et al.* sont les premiers à décrire comment mesurer un K_d sur un microarray présentant des lectines (Kuno et al., 2005) avec des mesures de fluorescence. Deux ans plus tard, la méthode est adaptée pour les glycoarrays (Park and Shin, 2007). Pour obtenir un K_d sur microarray, il est nécessaire de se placer en conditions d'excès de lectine par rapport au glycocluster et de faire varier sa concentration afin d'obtenir une isotherme. La constante de dissociation représente à l'équilibre la concentration de lectine nécessaire pour avoir 50 % des glycoclusters liés à la lectine. Plus le K_d est petit, plus l'équilibre de la réaction est atteint pour une faible concentration en lectine, donc plus l'interaction glycocluster/lectine est forte.

Cependant, dans le cas des sucres, ces mesures sont très influencées par la densité de surface, du fait de l'effet cluster de surface (cf. Chap. 3). Dans le cas présent, nous cherchons à éviter l'effet cluster de surface, afin d'évaluer *stricto sensu* l'effet de multivalence de la molécule proprement dite. Dans ce contexte, l'effet de la densité de surface sur les mesures de K_d et d'IC_{50} sur microarray basées sur la fluorescence reste encore très peu documenté, notamment

de par le fait que peu de ces microarrays permettent de quantifier au moins relativement la densité des sondes.

1.4.4. Comprendre les interactions moléculaires entre la lectine et le glycocluster grâce à la modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est une discipline qui fait appel à des méthodes théoriques permettant la compréhension et la prédiction de la structure, des propriétés physico-chimiques et des interactions moléculaires. Ces méthodes permettent de fournir des informations complémentaires à celles obtenues expérimentalement et/ou de valider des hypothèses émises pour l'interprétation des mesures expérimentales. En support aux études des interactions, la modélisation moléculaire permet donc de comprendre le moteur de la stabilisation d'un complexe.

Bénéficiant de l'augmentation toujours plus rapide de la puissance et de la capacité de calcul ainsi que des réseaux de communication, cette discipline est de plus en plus utilisée pour décrire des systèmes complexes comme le vivant. A chaque système d'étude correspond une méthode adéquate d'analyse et chaque méthode comporte des hypothèses, des approximations ainsi que des limitations. De nombreux modèles faisant appel aux méthodes de chimie quantique, mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, d'arrimage moléculaire (docking) ou encore de modélisation par homologie ont été décrits permettant de comprendre des systèmes simples vers des systèmes plus complexes. Enfin, chaque modèle fait appel aux données expérimentalement disponibles afin de décrire et prédire au mieux les structures et les interactions moléculaires. Il s'agit, par exemple en biologie, des données structurales d'une protéine obtenues grâce à la cristallographie. La base de données PDB (« Protein Data Bank ») rassemble toutes les données structurales de protéines obtenues jusqu'à aujourd'hui.

A l'instar de la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire prend en compte l'évolution du système dans le temps en considérant les mouvements moléculaires et modélise donc les atomes comme des « sphères en mouvement reliées par des ressorts ». En biologie, la méthode de dynamique moléculaire permet de décrire, notamment, la structure et les interactions moléculaires d'une biomolécule. L'arrimage moléculaire ou docking permet quant à lui de comprendre comment deux biomolécules interagissent ensemble comme un récepteur avec son ligand (Halperin et al., 2004; Liebeschuetz et al., 2012). Enfin, la modélisation par homologie permet de prédire la structure d'une protéine non résolue en la comparant à une protéine dont la structure est connue expérimentalement et qui présente des

homologies de séquence. Ces méthodes sont, notamment, fortement utilisées en pharmacologie et en « drug design ».

Les différentes méthodes de modélisation moléculaire utilisent des champs de force qui consistent à calculer l'énergie totale du système grâce à des paramètres obtenus expérimentalement. La difficulté est d'utiliser un champ de force en adéquation avec le système étudié et l'application visée. De nombreux champs de force ont été développés comme Tripos pour les molécules organiques, Amber initialement conçu pour les acides nucléiques puis étendu aux biomolécules mais aussi Charmm qui décrit plutôt les biomolécules complexes comme les protéines (Brooks et al., 1983; Clark et al., 1989; Cornell et al., 1995; MacKerell et al., 1998; Weiner et al., 1986). Enfin, ces méthodes sont basées sur le principe de la minimisation d'énergie afin de rechercher la structure de plus basse énergie et donc la conformation la plus stable.

Dans le cadre de cette thèse, les études ont été conduites par le Pr. Gérard Vergoten de l'Université de Lille qui a développé le champ de force SPASIBA (Spectroscopic Potential Algorithm for Simulating Biomolecular conformational Adaptability) (Derreumaux and Vergoten, 1995; Lagant et al., 2004). Ce champ de force ainsi qu'une méthode d'arrimage moléculaire faisant appel à la simulation probabiliste « Monte Carlo » ont été utilisés pour étudier les interactions entre glycocluster/lectine. Il en est notamment déduit l'énergie potentielle d'interaction du glycocluster/lectine (ΔE) correspondant à l'énergie du complexe à laquelle est soustraite les énergies du glycocluster et de la lectine libre.

1.5. Positionnement de la thèse

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène qui est la principale cause de mortalité chez les patients atteints de la mucoviscidose et qui est le 3ème germe impliqué dans les maladies nosocomiales en France. De part sa très grande adaptabilité métabolique et sa capacité à former des biofilms, PA a développé de nombreux mécanismes de résistance que ce soit pour se protéger du système immunitaire de l'hôte ou des traitements antibiotiques. C'est pourquoi, rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant *Pseudomonas aeruginosa* est devenu un enjeu majeur pour le domaine médical.

Pour exercer sa pathogénicité, PA possède un arsenal de facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, les lectines de *Pseudomonas aeruginosa* ont un rôle majeur dans son adhésion aux tissus de l'hôte et dans la formation et la stabilisation de son biofilm sur ces tissus. Une des stratégies émergentes pour combattre PA est donc de cibler ces lectines. Il s'agit alors d'utiliser des

molécules présentant les sucres spécifiques de ces lectines afin d'empêcher leur activité (adhésion, formation du biofilm,...). Des études, *in vivo*, utilisant des monosaccharides pour cibler les lectines PA-IL et PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisées. Ainsi, l'administration de méthylgalactoside et de GalNAc pour cibler la lectine PA-IL chez des souris avant de les infecter avec *Pseudomonas aeruginosa* a montré un taux de survie de 30 % et une réduction de la destruction de leurs tissus pulmonaires (Chemani et al., 2009). De plus, l'inhalation de fucose et de galactose par des patients atteints de la mucoviscidose, afin de cibler simultanément les lectines PA-IL et PA-IIL, a montré une diminution de la quantité de bactéries ainsi que de la réponse inflammatoire dans les voies respiratoires de ceux-ci (Hauber et al., 2008). Ces résultats, obtenus avec des sucres simples monovalents, mettent en évidence le potentiel thérapeutique de cette approche consistant à empêcher l'action des lectines de PA. Comme exposé dans ce chapitre, les interactions lectines/sucres sont grandement favorisées par le « cluster glycoside effect » (cf. 1.3.2). Pour tirer profit de ce phénomène, la synthèse de ligands multivalents comme les glycoclusters présentant une forte affinité pour les lectines ciblées apparaît donc comme une voie prometteuse pour combattre les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa.* La synthèse de ces ligands multivalents est empirique et nécessite l'utilisation de méthodes analytiques pour évaluer *in vitro* leur affinité pour les lectines (cf. 1.4). Parmi celles-ci, les microarrays présentent l'avantage de pouvoir réaliser une analyse simultanée et en parallèle d'un grand nombre de ligands tout en utilisant une très faible quantité de matériel biologique (tout au plus quelques pmoles). Au contraire de l'analyse d'affinité de sucres simples, celles de ligands multivalents immobilisés sur microarray est aujourd'hui encore peu développée. L'une des limitations principales de ces microarray est que le signal émis ne dépend pas seulement de l'affinité entre la sonde (sucres simples ou multivalents) et la cible (lectine) mais aussi de la façon dont la sonde est immobilisée (densité, orientation, ...). Néanmoins, ils permettent le criblage d'un grand nombre de ligands et d'acquérir ainsi un grand nombre de données sur les interactions ligand/lectine. De plus, ils permettent également d'obtenir des données semi-quantitatives à quantitatives (IC_{50} et K_d) des interactions ligand/lectine.

A ce jour, aucun ligand multivalent ciblant les lectines du flagelle (FliC, FliD) et des *pili* (PilA, PilY1, CupB6) de *Pseudomonas aeruginosa* n'est rapportée dans la littérature. C'est pourquoi, mes travaux de thèse s'articulent autour de la recherche de ligands multivalents pertinents présentant une forte affinité pour ces lectines du flagelle et des *pili* mais aussi de deux lectines solubles : PA-IL et PA-IIL. Pour cela, il a été utilisé le glycocluster-microarray développé au laboratoire pour caractériser l'interaction glycocluster/lectine. Ce glycocluster-

microarray permet une immobilisation ordonnée et orientée des glycoclusters par DDI ainsi qu'une immobilisation contrôlée grâce à la fluorescence émise par le Cy3 greffé aux glycoclusters. Le premier volet de ma thèse a été d'étudier l'influence des conditions expérimentales et notamment de la densité de surface en glycocluster sur l'évaluation de leur affinité pour la lectine ciblée sur microarray (mesure d'IC_{50} et de K_d). Une bibliothèque de plus de 150 sucres provenant de l'OligoTech® de la société Elicityl a aussi été utilisée afin d'identifier des ligands potentiels des sept lectines étudiées. Pour cela, une méthode originale utilisant le glycocluster-microarray et permettant le criblage rapide de ces sucres naturels a été développée. Les sucres présentant de l'affinité pour les lectines testées ont été utilisés pour synthétiser des ligands multivalents (glycoclusters) par nos collègues de l'IBMM de Montpellier. Des glycoclusters ayant différentes structures permettant différentes topologies et natures de bras ont aussi été synthétisés. L'activité de ces glycoclusters vis-à-vis des lectines de PA a ensuite été évaluée sur le glycocluster-microarray. Ces études complétées par de la modélisation moléculaire effectué par le Pr. Gérard Vergoten de l'UGSF de Lille ont permis de mieux comprendre les relations structure-activité régissant les interactions glycocluster/lectine.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Bibliothèque de sucres naturels testés

Lors de ces travaux de thèse, il a été criblé des sucres issus de l'OligoTech® de la société Elicityl qui est un partenaire de l'ANR PA-Control. Il s'agit d'une bibliothèque de 156 sucres issus de la biomasse ou produits soit par fermentation bactérienne, soit par dépolymérisation enzymatique ou acide. Cette bibliothèque est constituée d'une grande diversité de structures allant de l'oligosaccharide au polysaccharide permettant l'identification de ligands potentiels pour les lectines testées. La structure développée est présentée en Annexe A.

2.1.1. Les oligosaccharides issus de la fermentation bactérienne

Famille	Structure	Réf.	Id.
Core structures	Galβ1-3GlcNAcβ1-4Gal	GLY005	1
	Galβ1-4GlcNAcβ1-4Gal	GLY006	2
	Galβ-3GlcNAc	GLY009	3
	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY010	4
	GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY011	5
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY021	6
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY022	7
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY023	8

Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Gal	GLY030	9
	Fucα1-2Galβ1-4Glc	GLY031-3	10
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	GLY032-1	11
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	GLY032-2	12
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY033-1	13
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY033-2	14
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal	GLY034	15
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	GLY035-3	16
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	GLY036-1	17
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	GLY036-2	18
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY037-1	19
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY037-2	20
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	GLY038-3	21
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	GLY039-1	22
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	GLY039-2	23
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY040-1	24
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY040-2	25
	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	GLY050	26
	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY051	27
	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	GLY052	28
	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	GLY053	29
	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	GLY054	30
	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY055	31
	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	GLY056	32
Oligosaccharides fucosylés	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY060	33
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY061	34
	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY062	35
	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY063	36
	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY064	37
	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY066	38
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY067	39
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	GLY068	40
Oligosaccharides à motif « Galα1-3Gal »	Galα1-3Galβ1-4Glc	GLY070	41
	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY071	42
	GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	GLY072	43
	Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	GLY073	44
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)2Galβ1-4Glc	GLY077	45
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)3Galβ1-4Glc	GLY078	46
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)4Galβ1-4Glc	GLY079	47

Oligosaccharides sialilés	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	GLY080	48
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	GLY081	49
	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	GLY082	50
	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY083	51
	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glc	GLY089	52
Oligosaccharides type ganglioside	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc	GLY090	53
	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc	GLY091	54
	Neu5Acα2-8Neu5Acβ2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc	GLY092	55
	GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY093	56
	GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY094	57
	GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY095	58
	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY096	59
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	GLY097	60
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY098	61
	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY099	62
	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY100	63
	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY101	64
	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	GLY102	65
	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY103	66
	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	GLY104	67
	Galβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	GLY111	68
Oligosaccharides type globoside (antigènes P)	Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY120	69
	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY121	70
	Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY122	71
	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY123	72
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY124	73
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY125	74
Core structure	Galβ1-3GalNAc β1-3Gal	GLY126	75
Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	GLY127	76
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	GLY128	77
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	GLY129	78
Oligosaccharides type globoside (antigènes P)	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	GLY130	79
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY131	80
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY132	81
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Gal	GLY133	82
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	GLY134	83

Disaccharides	GalNAcβ1-3Gal	GLY151	84
	Galα1-3Gal	GLY153	85
	Galα1-4Gal	GLY154	86
	GlcNAcβ1-3Gal	GLY155	87
	Neu5Acα2-3Gal	GLY157	88
Oligosaccharides dérivant du tréhalose	Galβ1-4Glcβ1-1βGal	GLY160	89
	Fucα1-2Galβ1-4Glcβ1-1βGalα2-1Fuc	GLY161	90
	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ1-1βGalα2-3Neu5Ac	GLY162	91
Antigènes dérivant des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	GLY163	92
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	GLY164	93
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	GLY165	94
Oligosaccharides dérivant des globosides (antigènes P)	Neu5Acα2-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY171	95
Oligosaccharides sialilés	NeuAcα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	GLY172	96
Oligosaccharides dérivant des gangliosides	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	GLY174	97
Oligosaccharides glucuroniques	GlcAβ1-3Galβ1-4Glc	GLY180	98
	GlcAβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	GLY181	99
Oligosaccharides dérivant des globosides (antigènes P)	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY191-1	100
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY191-2	101
	NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	GLY195-1	102
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	GLY201-1	103

Tableau 2-1 : Liste des oligosaccharides produits par fermentation bactérienne.

Gal = Galactose, Glc = Glucose, Fuc = Fucose, NeuAc = Acide sialique, NAc = *N*-Acétyle

2.1.2. Les oligosaccharides et polysaccharides extraits de la biomasse

Famille	Structure	Réf.	Id.
Alginates	L-guluronate lié en α(1-4), DP≈20	ALG300	104
	L-guluronate lié en α(1-4), DP≈10	ALG310	105
	L-guluronate lié en α(1-4), DP≈5	ALG320	106
	L-guluronate lié en α(1-4), DP≈3	ALG330	107
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 20	ALG500	108
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 10	ALG510	109
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 5	ALG520	110
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 3	ALG530	111
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 30-50	ALG600	112
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 20-35	ALG601	113
Galacturonanes	D-galacturonate lié en α(1-4), DP≈25	GAT110	114
	D-galacturonate lié en α(1-4), DP=3/4	GAT111	115
	D-galacturonate lié en α(1-4), DP=7/8	GAT112	116

Glucanes	oligosaccharides avec environ 80 % GXLF	GLU1000	117
	oligosaccharides avec environ 80% de XFG	GLU1110	118
	oligosaccharides avec environ 60% de XXFG	GLU1150	119
	oligosaccharides avec environ 60% de XLFG	GLU1160	120
	Glcβ1-4Glc	GLU300	121
	Glcβ1-4Glcβ1-4Glc	GLU301	122
	Glcβ1-4Glcβ1-4Glcβ1-4Glc	GLU302	123
	Glcβ1-4[Glcβ1-4Glc]$_3$Glc	GLU303	124
	Glcβ1-4[Glcβ1-4Glc]$_4$Glc	GLU304	125
	Glcα1-4Glc	GLU312	126
	Glcα1-4Glcα1-4Glc	GLU313	127
	Glcα1-4Glcα1-4Glcα1-4Glc	GLU314	128
	Glcα1-4[Glcα1-4Glc]$_3$Glc	GLU315	129
	Glcα1-4[Glcα1-4Glc]$_4$Glc	GLU316	130
	Glcα1-4[Glcα1-4Glc]$_5$Glc	GLU317	131
	GlcNAcβ1-4GlcNAc	GLU432	132
	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc	GLU433	133
	GlcNAcβ1-4[GlcNAcβ1-4GlcNAc]$_2$GlcNAc	GLU434	134
	GlcNAcβ1-4[GlcNAcβ1-4GlcNAc]$_3$GlcNAc	GLU435	135
	GlcNAcβ1-4[GlcNAcβ1-4GlcNAc]$_4$GlcNAc	GLU436	136
	[Glcβ1-6Glc]$_n$, DP ≤ 10	GLU910	137
Mannanes	[Manβ1-4(Galα1-6)Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 2:1	MAN200	138
	[Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1	MAN201	139
	[(Galα1-6)Manβ1-4[(Galα1-6)Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 1:1	MAN202	140
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 3.	MAN213	141
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 5.	MAN215	142
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 9.	MAN219	143
	Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man	MAN300	144
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP = 3.	MAN400	145
	Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man	MAN500	146
	Motif typique du polysaccharide : [Glcβ1-4GlcAcβ1-4Manβ1-4Man]$_n$ (Ratio$_{Man/Glc}$ ≈ 1/5)	MAN600	147
	Motif typique du polysaccharide : [Glcβ1-4GlcAcβ1-4Manβ1-4Man]$_n$	MAN610	148
	D-mannose lié en β(1-4)	MAN800	149
	D-mannose lié en β(1-4) partiellement O-acetylé	MAN801	150
	Polysaccharide de D-mannose relié en α(1-6) et fortement ramifié avec une chaine du D-Mannose en α(1-2) et α(1-3)	MAN802	151
	D-mannose lié en β(1-4), DP = 2 à 24	MAN810	152

Ulvanes	Oligosaccharides entre 3 et 5 kDa	ULV001	153
	Oligosaccharides entre 1 et 3 kDa	ULV002	154
	Oligosaccharides entre 0.65 et 1 kDa	ULV003	155
Xylane	Oligosaccharides avec DP = 2 à 25	XYL110	156

Tableau 2-2 : Liste des oligosaccharides et polysaccharides issus de la biomasse.

Gal = Galactose, Glc = Glucose, Man = Mannose, NAc = *N*-Acétyle, DP = Degré de polymérisation.

2.2. Bibliothèque de glycoclusters testés

Tous les glycoclusters présentés dans ces travaux de thèse ont été synthétisés par nos collègues de l'IBMM de Montpellier. Leur structure développée est présentée en annexe B.

2.2.1. Les glycoclusters ciblant PA-IL

Id.	Nom	Cœur	L1	L2	Sucre	n
TN_1	ADN simple brin	/	/	/	/	/
TN_2	(DMCH-MTzEG$_3$-Man)$_3$	DMCH	M	EG$_3$	Man	3
TP_1	DMCH-MTzEG$_3$-Gal	DMCH	M	EG$_3$	Gal	1
G1	Man(proTzEG$_3$-Gal)$_4$	Man	pro	EG$_3$	Gal	4
G2	Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$	Man	pro	AcNPh	Gal	4
1	Man(proTzEG$_2$NOCFurM-Gal)$_4$	Man	pro	EG$_2$NOCFurM	Gal	4
2	Man(EG$_2$MTzEG2NOCFurM-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	EG$_2$NOCFurM	Gal	4
3	Man(EG$_3$MTzEG2NOCFurM-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	EG$_2$NOCFurM	Gal	4
4	Man(proTzEG$_2$NOCThiophM-Gal)$_4$	Man	pro	EG$_2$NOCThiophM	Gal	4
5	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NOCThiophM-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	EG$_2$NOCThiophM	Gal	4
6	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOCThiophM-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	EG$_2$NOCThiophM	Gal	4
7	Man(proTzEG$_2$NOC^{3}Bn-Gal)$_4$	Man	pro	EG$_2$NOC^{3}Bn	Gal	4
8	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NOC^{3}Bn-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	EG$_2$NOC^{3}Bn	Gal	4
9	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOC^{3}Bn-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	EG$_2$NOC^{3}Bn	Gal	4
10	Man(proTzEG$_2$NOC^{3}PyrM-Gal)$_4$	Man	pro	EG$_2$NOC^{3}PyrM	Gal	4
11	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NOC^{3}PyrM -Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	EG$_2$NOC^{3}PyrM	Gal	4
12	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOC^{3}PyrM -Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	EG$_2$NOC^{3}PyrM	Gal	4
13	Man(EG$_2$MTzAcNBn-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcNBn	Gal	4
14	Man(EG$_3$MTzAcNBn-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcNBn	Gal	4
15	Man(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcNPh	Gal	4
16	Man(EG$_3$MTzAcNPh-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcNPh	Gal	4
17	Man(EG$_2$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	proNOCNapht	Gal	4
18	Man(EG$_3$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	proNOCNapht	Gal	4
19	Man(EG$_2$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	proNOCBiPh	Gal	4

20	Man(EG$_3$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	proNOCBiPh	Gal	4
21	Man(proTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	Man	pro	AcN^{2}PhOEt	Gal	4
22	Man(EG$_2$MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcN^{2}PhOEt	Gal	4
23	Man(EG$_3$MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcN^{2}PhOEt	Gal	4
24	Man(proTzAcN^{3}PhOEt-Gal)$_4$	Man	pro	AcN^{3}PhOEt	Gal	4
25	Man(EG$_2$MTzAcN^{3}PhOEt-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcN^{3}PhOEt	Gal	4
26	Man(EG$_3$MTzAcN^{3}PhOEt-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcN^{3}PhOEt	Gal	4
27	Man(proTzAcNPhOEt-Gal)$_4$	Man	pro	AcNPhOEt	Gal	4
28	Man(EG$_2$MTzAcNPhOEt-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcNPhOEt	Gal	4
29	Man(EG$_3$MTzAcNPhOEt-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcNPhOEt	Gal	4
30	Man(proTzAcTyr-Gal)$_4$	Man	pro	AcTyr	Gal	4
31	Man(EG$_2$MTzAcTyr-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcTyr	Gal	4
32	Man(EG$_3$MTzAcTyr-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcTyr	Gal	4
33	Man(proTzEG$_2$NTyr-Gal)$_4$	Man	pro	EG$_2$NTyr	Gal	4
34	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NTyr-Gal)$_4$	Man	EG$_2$M	EG$_2$NTyr	Gal	4
35	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NTyr-Gal)$_4$	Man	EG$_3$M	EG$_2$NTyr	Gal	4
36	Man(PS-EG$_2$MTzAcNBn-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_2$M	AcNBn	Gal	4
37	Man(PS-EG$_3$MTzAcNBn-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_3$M	AcNBn	Gal	4
38	Man(PS-EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_2$M	AcNPh	Gal	4
39	Man(PS-EG$_3$MTzAcNPh-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_3$M	AcNPh	Gal	4
40	Man(PS-EG$_2$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_2$M	proNOCBiPh	Gal	4
41	Man(PS-EG$_3$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_3$M	proNOCBiPh	Gal	4
42	Man(PS-EG$_2$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_2$M	proNOCNapht	Gal	4
43	Man(PS-EG$_3$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	Man	PS-EG$_3$M	proNOCNapht	Gal	4
44	Man(EG$_2$MTzAcNBn-SGal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcNBn-S	Gal	4
45	Man(EG$_3$MTzAcNBn-SGal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcNBn-S	Gal	4
46	Man(EG$_2$MTzAcNPh-SGal)$_4$	Man	EG$_2$M	AcNPh-S	Gal	4
47	Man(EG$_3$MTzAcNPh-SGal)$_4$	Man	EG$_3$M	AcNPh-S	Gal	4
48	Man(PS-EG$_2$MTzAcNBn-SGal)$_4$	Man	PS-EG$_2$M	AcNBn-S	Gal	4
49	Man(PS-EG$_3$MTzAcNBn-SGal)$_4$	Man	PS-EG$_3$M	AcNBn-S	Gal	4
50	Man(PS-EG$_2$MTzAcNPh-SGal)$_4$	Man	PS-EG$_2$M	AcNPh-S	Gal	4
51	Man(PS-EG$_3$MTzAcNPh-SGal)$_4$	Man	PS-EG$_3$M	AcNPh-S	Gal	4
52	Man(hexSMAcNpro-Gal)$_4$	Man	hex	MAcNpro	Gal	4
53	Man(hexSMAcNEG$_3$-Gal)$_4$	Man	hex	MAcNEG$_3$	Gal	4
54	Man(hexSAcNPh-Gal)$_4$	Man	hex	AcNPh	Gal	4
55	Man(EG$_2$SMAcNpro-Gal)$_4$	Man	EG$_2$	MAcNpro	Gal	4
56	Man(EG$_2$SMAcNEG$_3$-Gal)$_4$	Man	EG$_2$	MAcNEG$_3$	Gal	4
57	Man(EG$_2$SAcNPh-Gal)$_4$	Man	EG$_2$	AcNPh	Gal	4
58	Man(EG$_3$SMAcNpro-Gal)$_4$	Man	EG$_3$	MAcNpro	Gal	4

59	Man(EG$_3$SMAcNEG$_3$-Gal)$_4$	Man	EG$_3$	MAcNEG$_3$	Gal	4
60	Man(EG$_3$SAcNPh-Gal)$_4$	Man	EG$_3$	AcNPh	Gal	4
61	Man(EG$_4$SMAcNpro-Gal)$_4$	Man	EG$_4$	MAcNpro	Gal	4
62	Man(EG$_4$SMAcNEG$_3$-Gal)$_4$	Man	EG$_4$	MAcNEG$_3$	Gal	4
63	Man(EG$_4$SAcNPh-Gal)$_4$	Man	EG$_4$	AcNPh	Gal	4
64	Man(EG$_4$TzMNAc-Core type2)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Core type2	4
65	Man(EG$_4$TzMNAc-LNnT)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	LNnT	4
66	Man(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	4GrB	4
67	Man(EG$_4$TzMNAc-6GrB)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	6GrB	4
68	Man(EG$_4$TzMNAc-Galα1-3Gal)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Galα1-3Gal	4
69	Man(EG$_4$TzMNAc-Galα1-4Gal)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Galα1-4Gal	4
70	(DMCH-ProTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	DMCH	Pro	ProNOCBiPh	Gal	4
71	(DMCH-DMCHMTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	DMCH	DMCHM	ProNOCBiPh	Gal	4
72	(DMCH-PSProTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	DMCH	PS-Pro	ProNOCBiPh	Gal	4
73	(DMCH-PSDMCHMTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	DMCH	PS-DMCHM	ProNOCBiPh	Gal	4
74	(DMCH-ProTzProNOCNapht-Gal)$_4$	DMCH	Pro	ProNOCNapht	Gal	4
75	(DMCH-DMCHMTzProNOCNapht-Gal)$_4$	DMCH	DMCHM	ProNOCNapht	Gal	4
76	(DMCH-PSProTzProNOCNapht-Gal)$_4$	DMCH	PS-Pro	ProNOCNapht	Gal	4
77	(DMCH-PSDMCHMTzProNOCNapht-Gal)$_4$	DMCH	PS-DMCHM	ProNOCNapht	Gal	4
78	(DMCH-ProTzAcNPh-Gal)$_4$	DMCH	Pro	AcNPh	Gal	4
79	(DMCH-DMCHMTzAcNPh-Gal)$_4$	DMCH	DMCHM	AcNPh	Gal	4
80	(DMCH-PSProTzAcNPh-Gal)$_4$	DMCH	PS-Pro	AcNPh	Gal	4
81	(DMCH-PSDMCHMTzAcNPh-Gal)	DMCH	PS-DMCHM	AcNPh	Gal	4
82	(DMCH-ProTzAcNPh-SGal)$_4$	DMCH	Pro	AcNPh-S	Gal	4
83	(DMCH-DMCHMTzAcNPh-SGal)$_4$	DMCH	DMCHM	AcNPh-S	Gal	4
84	(DMCH-PSProTzAcNPh-SGal)$_4$	DMCH	PS-Pro	AcNPh-S	Gal	4
85	(DMCH-PSDMCHMTzAcNPh-SGal)$_4$	DMCH	PS-DMCHM	AcNPh-S	Gal	4
86	(DMCH-MTzAcNPh-Gal)$_3$	DMCH	M	AcNPh	Gal	3
87	(DMCH-MTzAcNPh-Gal)$_4$	DMCH	M	AcNPh	Gal	4
88	(DMCH-MTzAcNPh-Gal)$_5$	DMCH	M	AcNPh	Gal	5
89	Mannitol(proTzAcNPh-Gal)$_5$	Mannitol	pro	AcNPh	Gal	5
90	Mannitol(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_5$	Mannitol	EG$_2$M	AcNPh	Gal	5
91	Mannitol[Thme(MTzAcNPh-Gal)$_2$]$_5$	Mannitol	M	AcNPh	Gal	10
92	Ribo(proTzAcNPh-Gal)$_3$	Ribo	pro	AcNPh	Gal	3
93	Ribo(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_3$	Ribo	EG$_2$M	AcNPh	Gal	3
94	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Core type2)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Core type2	3
95	Ribo(EG$_4$TzMNAc-LNnT)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	LNnT	3
96	Ribo(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	4GrB	3
97	Ribo(EG$_4$TzMNAc-6GrB)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	6GrB	3

98	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Galα1-3Gal)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Galα1-3Gal	3
99	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Galα1-4Gal)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Galα1-4Gal	3
100	Ara(proTzAcNPh-Gal)$_3$	Ara	pro	AcNPh	Gal	3
101	Ara(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_3$	Ara	EG$_2$M	AcNPh	Gal	3
102	Xylo(proTzAcNPh-Gal)$_3$	Xylo	pro	AcNPh	Gal	3
103	Xylo(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_3$	Xylo	EG$_2$M	AcNPh	Gal	3
104	THME-hexTzMNAc-Core type2	THME	hex	MNAc	Core type2	1
105	THME-hexTzMNAc-LNnT	THME	hex	MNAc	LNnT	1
106	THME-hexTzMNAc-4GrB	THME	hex	MNAc	4GrB	1
107	THME-HexTzMNAc-6GrB	THME	hex	MNAc	6GrB	1
108	THME-hexTzMNAc-Galα1-3Gal	THME	hex	MNAc	Galα1-3Gal	1
109	THME-HexTzMNAc-Galα1-4Gal	THME	hex	MNAc	Galα1-4Gal	1

Tableau 2-3 : Liste des glycoclusters ciblant PA-IL.

TN = Témoin négatif, TP = Témoin positif, Ara = Arabinose, Ribo = Ribose, Xylo = Xylose, DMCH = 1,4-Dimethylcyclohexane, THME = 1,1,1-(trishydroxyméthyl)éthane, Gal = Galactose, Man = Mannose, Glc = Glucose, M = Méthyle, Et = Ethyle, Pro = Propyle, Hex = Hexyle, EG$_{2/3/4}$ = Di/Tri/Tétra-éthylène glycol, PS = Phosphorothioate, Tz = Triazole, NAc = *N*-Acétyle, NCO = amide, Ph = Phényle, Bn = Benzyle, BiPh = Biphényle, Napht = Naphtyle, ThioPh = Thiophène, Fur = Furane, Pyr = Pyridine, Tyr = Tyrosine, LNnT = Lacto-*N*-neotetraose, 4/6GrB = Groupe sanguin B tétra/hexaose, Chiffre en exposant : 2 ou 3 ou Ø = régioisomérie ortho ou méta ou para.

2.2.2. Les glycoclusters ciblant PA-IIL

Id.	Nom	Cœur	L1	L2	Sucre	n
TN_1	ADN simple brin	/	/	/	/	/
TN_2	(DMCH-MTzEG$_3$-Gal)$_3$	DMCH	M	EG$_3$	Gal	3
TP_1	Thme-MTzEG$_3$-Fuc	THME	EG$_3$	EG$_3$	Fuc	1
TP_2	Man(proTz EG$_3$-Fuc)$_4$	Man	pro	EG$_3$	Fuc	4
110	Mannitol(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_5$	Mannitol	EG$_2$M	EG$_3$	Fuc	5
111	Mannitol(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	Mannitol	pro	EG$_3$	Fuc	5
112	Mannitol[Thme(MTzEG$_3$-Fuc)$_2$]$_5$	Mannitol	M	EG$_3$	Fuc	10
113	Ribo(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	Ribo	pro	EG$_3$	Fuc	5
114	Ribo(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_5$	Ribo	EG$_2$M	EG$_3$	Fuc	5
115	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ribo	EG$_2$	MNAc	Lewis^X	3
116	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	3
117	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ribo	EG$_2$	MNAc	Lewis^B	3
118	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	3
119	Ribo(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	Ribo	EG$_2$	MNAc	3FL	3
120	Ribo(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	3FL	3
121	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ribo	EG$_2$	MNAc	Lewis^A	3
122	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	3

123	Ribo(EG$_4$TzMNAc-sLewis^X)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	sLewis^X	3
124	Ara(proTzEG$_3$-Fuc)$_3$	Ara	pro	EG$_3$	Fuc	3
125	Ara(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_3$	Ara	EG$_2$M	EG$_3$	Fuc	3
126	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ara	EG$_2$	MNAc	Lewis^X	3
127	Ara(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ara	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	3
128	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ara	EG$_2$	MNAc	Lewis^B	3
129	Ara(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ara	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	3
130	Ara(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	Ara	EG$_2$	MNAc	3FL	3
131	Ara(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_3$	Ara	EG$_4$	MNAc	3FL	3
132	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ara	EG$_2$	MNAc	Lewis^A	3
133	Ara(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ara	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	3
134	Xylo(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	Xylo	pro	EG$_3$	Fuc	3
135	Xylo(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_5$	Xylo	EG$_2$M	EG$_3$	Fuc	3
136	Xylo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Xylo	EG$_2$	MNAc	Lewis^X	3
137	Xylo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Xylo	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	3
138	Xylo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Xylo	EG$_2$	MNAc	Lewis^B	3
139	Xylo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Xylo	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	3
140	Xylo(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	Xylo	EG$_2$	MNAc	3FL	3
141	Xylo(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_3$	Xylo	EG$_4$	MNAc	3FL	3
142	Xylo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Xylo	EG$_2$	MNAc	Lewis^A	3
143	Xylo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Xylo	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	3
144	Man(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Man	EG$_2$	MNAc	Lewis^X	4
145	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	4
146	Man(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Man	EG$_2$	MNAc	Lewis^B	4
147	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	4
148	Man(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$	Man	EG$_2$	MNAc	3FL	4
149	Man(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	3FL	4
150	Man(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Man	EG$_2$	MNAc	Lewis^A	4
151	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	4
152	Man(EG$_4$TzMNAc-sLewis^X)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	sLewis^X	4
153	Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Glc	EG$_2$	MNAc	Lewis^X	4
154	Glc(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Glc	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	4
155	Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Glc	EG$_2$	MNAc	Lewis^B	4
156	Glc(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Glc	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	4
157	Glc(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$	Glc	EG$_2$	MNAc	3FL	4
158	Glc(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_4$	Glc	EG$_4$	MNAc	3FL	4
159	Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Glc	EG$_2$	MNAc	Lewis^A	4
160	Glc(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Glc	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	4
161	Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Gal	EG$_2$	MNAc	Lewis^X	4

162	Gal(EG_4TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Gal	EG_4	MNAc	Lewis^X	4
163	Gal(EG_2TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Gal	EG_2	MNAc	Lewis^B	4
164	Gal(EG_4TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Gal	EG_4	MNAc	Lewis^B	4
165	Gal(EG_2TzMNAc-3FL)$_4$	Gal	EG_2	MNAc	3FL	4
166	Gal(EG_4TzMNAc-3FL)$_4$	Gal	EG_4	MNAc	3FL	4
167	Gal(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Gal	EG_2	MNAc	Lewis^A	4
168	Gal(EG_4TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Gal	EG_4	MNAc	Lewis^A	4
169	THME-HexTzMNAc-Lewis^X	THME	hex	MNAc	Lewis^X	1
170	THME-HexTzMNAc-Lewis^B	THME	hex	MNAc	Lewis^B	1
171	THME-HexTzMNAc-3FL	THME	hex	MNAc	3FL	1
172	THME-HexTzMNAc-Lewis^A	THME	hex	MNAc	Lewis^A	1
173	THME-HexTzMNAc-sLewis^X	THME	hex	MNAc	sLewis^X	1

Tableau 2-4 : Liste des glycoclusters ciblant PA-IIL.

TN = Témoin négatif, TP = Témoin positif, Ara = Arabinose, Ribo = Ribose, Xylo = Xylose, DMCH = 1,4-Dimethylcyclohexane, THME = 1,1,1-(trishydroxyméthyl)éthane, Man = Mannose, M = Méthyle, Pro = Propyle, Hex = Hexyle, $EG_{2/3/4}$ = Di/Tri/Tétra-éthylène glycol, Tz = Triazole, NAc = *N*-Acétyle, Fuc = Fucose, 3FL = 3-Fucosyllactose, sLewis^X = sialyl-Lewis^X.

2.2.3. Les glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et des *pili*

Id.	Nom	Cœur	L1	L2	Sucre	n
174	Man(EG_4TzMNAc-aGM2)$_4$	Man	EG_4	MNAc	aGM2	4
175	Man(EG_2MTzpro-GalNAcβ1-4Gal)$_4$	Man	EG_2M	pro	GalNAcβ1-4Gal	4
176	Man(EG_2TzM-triaose_Lewis^X)$_4$	Man	EG_2	M	triaose_Lewis^X	4

Tableau 2-5 : Liste des glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et/ou des pili.

Man = Mannose, M = Méthyle, Pro = Propyle, $EG_{2/4}$ = Di/Tétra-éthylène glycol, Tz = Triazole, NAc = *N*-Acétyle, Gal = Galactose, aGM2 = asialoGM2.

Les glycoclusters possédant les motifs saccharidiques sLewis^X, Lewis^X et Lewis^B, dans la liste des glycoclusters ciblant PA-IIL, ciblent aussi les lectines du flagelle et des *pili* de PA.

2.3. La fabrication du DDI-microarray

Le DDI microarray est une lame de verre (Borosilicate, Nexterion D, Schott GMBH, Allemagne) microstructurée avec 40 puits et fonctionnalisée avec une chimie de surface permettant l'ancrage covalent de simples brins d'ADN puis l'immobilisation par hybridation d'ADN de glycoclusters (Chevolot et al., 2007a; Zhang et al., 2009b).

2.3.1. La fabrication du support microstructuré

Les lames de verre sont microstructurées par un procédé de xurographie qui consiste, grâce à un masque de vinyle autocollant, à former 40 micropuits carrés de 3 mm de largeur, 102 ± 1 µm de profondeur et espacés de 4.5 mm. Cette technique présente l'avantage d'être peu onéreuse, simple et rapide à mettre en œuvre. Elle permet la production d'un grand nombre de microarray en peu de temps par rapport à d'autres techniques comme la lithographie (Renaud et al., 2015). Néanmoins, la résolution de la microstructuration et notamment la qualité des flancs de gravure est inférieure à celle obtenue en lithographie. Cependant, la profondeur des puits a été vérifiée pour chaque lot de production et montre une variation intra- et inter-puits de moins de 1 % (Figure 2-1).

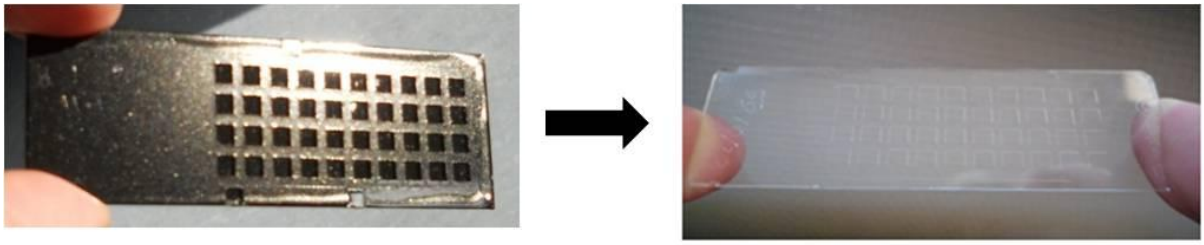


Figure 2-1 : Photos du microarray avec le masque de vinyle avant gravure (à gauche) et après gravure (à droite).

Pour réaliser la microstructuration des lames de verre, celles-ci sont d'abord lavées avec une solution contenant 2 % d'Hellmanex III (Hellma Analytics) pendant 2 heures, puis 30 minutes dans un bain à ultrasons. Les lames sont ensuite rincées 3 fois et lavées 15 minutes dans un bain à ultrasons avec de l'eau ultrapure (18.2 MΩ). Après avoir séché les lames à la centrifugeuse, un masque de vinyle autocollant est mis sur chacune d'entre elles. Les lames sont ensuite plongées dans une solution de gravure pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation afin de permettre la gravure des micropuits. Cette solution est appelée BOE pour « Buffered Oxide Etchant » et est composée de : 1:2:2 ; v/v/v ; (fluorure d'ammonium/acide fluoridrique, 7:1, v/v) / 37 % d'acide chlorhydrique / eau ultrapure. Après l'incubation dans la solution de gravure, les lames sont lavées avec de l'eau ultrapure et les masques sont enlevés. Puis, les lames sont lavées pendant 30 minutes à l'acétone puis rincées à l'éthanol et à l'eau ultrapure. Cette procédure de xurographie est réalisée en salle blanche.

2.3.2. Chimie de surface utilisée pour activer le microarray

La surface des lames de verre microstructurées est fonctionnalisée avec des groupements NHS ester pour permettre l'immobilisation covalente de biomolécules via leur fonction amine primaire (ici ADN-C_6-NH_2) et ainsi former un amide (Figure 2-2).

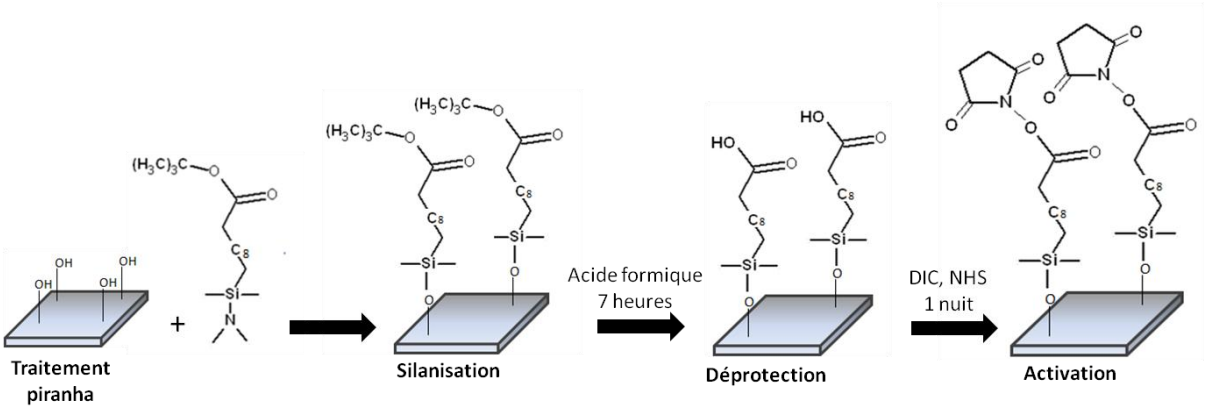


Figure 2-2 : Représentation schématique de la silanisation, la déprotection et l'activation d'un micropuits de la lame microstructurée.

Les lames de verre microstructurées sont silanisées en utilisant un protocole en phase gaz (Phaner-Goutorbe et al., 2011). Après un lavage avec une solution de piranha (peroxyde d'hydrogène 30 %/acide sulfurique, 1:2, v/v) et rinçage à l'eau ultrapure, les lames sont chauffées à 150 °C pendant 2 heures, sous un flux d'azote anhydre. Il est ensuite vaporisé 1 mL de *tert*-butyl-11-(dimethylamino)silylundecanoate (TDSUM) à 145 °C sous une pression comprise entre 4.10^{-1} et 10^{-1} mbar et laissé réagir pendant 12 heures à 150 °C. Les lames sont ensuite lavées avec du tétrahydrofurane (THF) et de l'eau ultrapure pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons.

Ainsi silanisées, les lames sont ensuite déprotégées, ce qui consiste à transformer le *tert*-butyl ester en son acide. La réaction se fait avec de l'acide formique, pendant 7 heures à température ambiante sous agitation, dans un réacteur et un porte lame préalablement lavés avec une solution de piranha. Puis, les lames sont successivement lavées avec du dichlorométhane et de l'eau ultrapure pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons. Les lames ainsi fonctionnalisées peuvent être conservées à l'abri de l'humidité pendant plusieurs mois.

Les lames fonctionnalisées avec des groupements acides carboxyliques sont activées avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) à 0.1 M et di(isopropyl)carbodiimide (DIC) à 0.1 M dans du THF anhydre pendant une nuit à température ambiante et sous faible agitation. Enfin, les lames sont lavées dans du THF puis dans du dichlorométhane pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons. Les lames de verre ainsi activées sont stables à l'abri de l'humidité pendant maximum un mois.

2.3.3. Immobilisation covalente d'un simple brin d'ADN

Les séquences d'oligonucléotides (ADN) modifiées avec une chaine à 6 carbones se terminant par une amine primaire et utilisées pendant cette thèse ont été achetées chez Eurogentec. 11 séquences d'ADN ont été choisies pour leur spécificité et rendement d'hybridation (Tableau 2-6).

Réf.	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- (CH2)7-NH_2	56,0	59.6
Zip 1.5	5'-CCA GCA GTG GAG AGC TTT - (CH2)7-NH_2	56,0	57.5
Zip 1.6	5'-GCA GAG AGC GTG CCA TTT - (CH2)7-NH_2	56,0	59.7
Zip 1.8	5'-AGT GGA GGT CAA CGA GCA ATT T - (CH2)7-NH_2	45,0	62.2
Zip 1.9	5'-AGG AGG AAC GCT CTA TCG CTT T -(CH2)7-NH_2	50,0	62.4
Zip 1.10	5'-TGT GGA CTT GGT TTC TTT-(CH2)7-NH_2	39,0	50.6
Zip 1.11	5'-ATA AGT ATT GGA CAA CTT GTT T-(CH2)7-NH_2	27,0	50.5
Zip 1.13	5'-ACA GTT GTT GGC GGT TGC TTT T-(CH2)7-NH_2	45,0	53.9

Tableau 2-6 : Séquences ADN utilisées pour ces travaux de thèse avec leur % GC et leur température de fusion Tm.

Les travaux de thèse réalisés par le Dr. Alice Goudot ont montré que ces séquences étaient capables de s'hybrider avec des taux d'hybridation similaires et avec un taux de cross-hybridation inférieur à 10 %. Ainsi, 11 glycoclusters portant chacun une de ces 11 séquences d'ADN peuvent être testés simultanément dans une même solution.

Les ADN modifiés avec un C_6-NH_2 sont préparés à 25 µM dans une solution de PBS 10X (phosphate buffered saline), pH : 8.5, préalablement filtrée (filtre 0.22 µM) afin d'éliminer les particules. Les solutions d'ADN sont ensuite spottées à l'aide d'un spotter piézoélectrique SCIENION sciFLEXARRAYER s3 qui permet de déposer environ 400 pL de solution par spot. Les étapes de spotting se font sous atmosphère contrôlée en hygrométrie à 85 % d'humidité relative. Pour permettre l'immobilisation covalente des ADNs, le microarray est placé pendant 3 heures dans une boîte de Petri saturée en humidité, puis pendant 3 heures dans un environnement sec. Le microarray est ensuite lavé pendant 30 minutes à 70 °C avec une solution de SDS 0.1 % (sodium dodecyl sulfate) afin d'éliminer les brins d'ADN adsorbés puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché à la centrifugeuse (Figure 2-3).

Afin de faire varier la densité de surface en glycocluster, des solutions d'ADN modifiés avec un C_6-NH_2 ont aussi été préparées à 0.1, 0.5, 1 et 10 µM dans une solution de PBS 10X (pH 8.5) et spottées sur le microarray suivant le même protocole décrit ci-dessus (cf. Chap. 3).

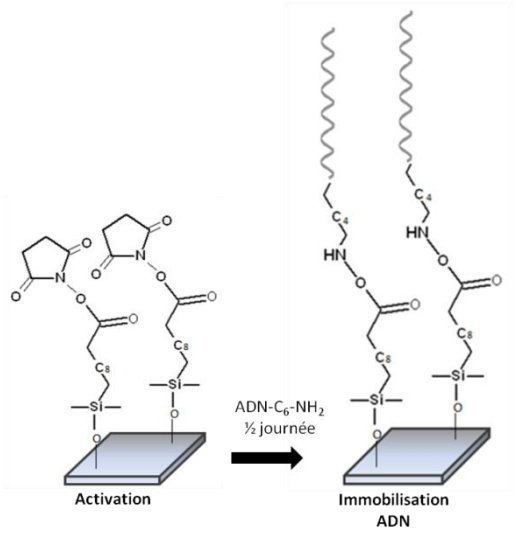


Figure 2-3 : Représentation schématique de l'immobilisation covalente de simples brins d'ADN sur la lame de verre microstructurée.

Le microarray subit ensuite une étape de saturation de la surface (capping) avec la BSA (albumine de sérum bovin) afin d'éviter les interactions non spécifiques entre la sonde et la cible. Cela a pour but de diminuer le bruit de fond et ainsi augmenter la sensibilité de la détection. L'étape de capping consiste à plonger le microarray dans une solution de BSA 4 % préparée dans du PBS 1X (pH 7.4) pendant 2 heures à 37°C. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.05% (T : Tween20) 3 fois 3 minutes sous agitation, puis dans du PBS 1X (pH 7.4) 3 fois 3 minutes sous agitation et enfin rincé avec de l'eau ultrapure avant séchage à la centrifugeuse. Cette étape de capping est répétée avec une incubation d'une heure après l'immobilisation des glycoclusters. Alternativement au capping à la BSA, il a aussi été testé un capping au PFBB (Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer, ThermoFisher) pour les lectines issues du flagelle et des *pili* de *Pseudomonas aeruginosa.* Les microarrays ont alors été incubés pendant une heure à température ambiante dans la solution PFBB et lavés comme décrit précédemment.

2.3.4. Immobilisation du glycocluster

Le microarray fonctionnalisé avec des simples brins d'ADN peut maintenant être mis en contact avec une solution de glycoclusters possédant les brins d'ADN complémentaires pour permettre leur immobilisation par hybridation d'ADN (cf. 1.4.3.1).

La solution de glycoclusters à 1 µM est préparée dans du PBS1 X (pH 7.4) et 1.5 µL de solution est déposée sur chaque micropuits. L'hybridation se fait pendant 2 heures à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de SSC 2X (Saline Sodium Citrate) et SDS 0.1 % pendant 1 minute à 51°C,

puis dans du SSC 2X pendant 5 minutes à température ambiante sous agitation. Enfin, le microarray est rincé avec de l'eau ultrapure puis séché en centrifugeant et scanné à la longueur d'onde d'excitation de 532 nm (Figure 2-4). L'immobilisation des glycoclusters par hybridation d'ADN sur le microarray possède un coefficient de variation inférieur à 15 %.

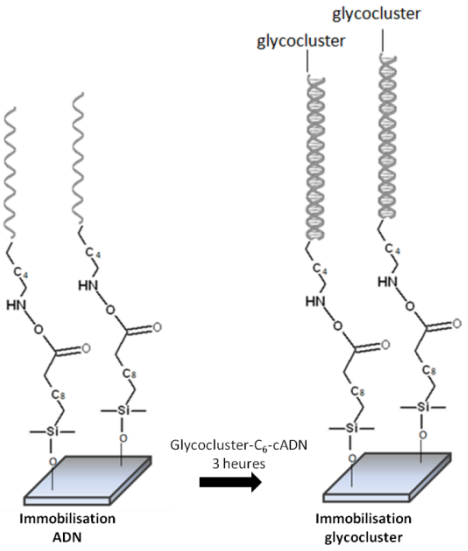


Figure 2-4 : Représentation schématique de l'immobilisation des glycoclusters par hybridation d'ADN à la surface du DDI-microarray.

2.3.4.1. Caractérisation AFM de la surface fonctionnalisée avec des glycoclusters

Pour des raisons de rugosité de surface, la caractérisation de la surface fonctionnalisée avec des glycoclusters a été menée sur SiO_2 (Peak to valley = 0.4 ± 0.1 nm) et non sur les substrats habituels (Nexterion Glass D, Schott, peak to valley = 1.5 ± 0.2 nm) (Phaner-Goutorbe et al., 2011). Nous avons travaillé avec le glycocluster G2, Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$ qui a été immobilisé dans les mêmes conditions que décrites précédemment et en utilisant la plus forte concentration en ADN simple brin (25 µM). L'immobilisation sur la surface a été vérifiée par une lecture de fluorescence à 532 nm. Ensuite, il a été utilisé l'appareil AFM Smena B (NT-MDT), pour effectuer des images en mode de contact et en modulation d'amplitude. Les images en mode de contact ont été effectuées en milieu liquide avec une pointe en nitrure de silicium d'une raideur de 0.02 à 0.1 $N.m^{-1}$ et avec une force appliquée de 0.5 à 3 nN pour ne pas endommager l'échantillon. En modulation d'amplitude, les images ont été obtenues avec une pointe en nitrure de silicium d'une raideur de 3 à 16 $N.m^{-1}$ et une fréquence de résonance entre 115 et 200 kHz. L'amplitude fixe de consigne (setpoint) a été maintenue entre 60 et 90 % d'amplitude libre afin de travailler, dans la plupart du temps, en régime attractif.

2.4. Méthode d'analyse des interactions sonde/cible avec le DDI-microarray

Le glycocluster-microarray ainsi préparé est utilisé pour faire différents tests de reconnaissance avec une cible, la lectine. Pour cela, il est d'abord nécessaire de marquer la lectine avec un fluorophore, l'Alexa Fluor® 647.

2.4.1. Préparation de la lectine

2.4.1.1. Marquage de la lectine

Pour réaliser ce marquage il faut, l'Alexa Fluor® 647 NHS ester (MM ≈ 1250 g/mol), du bicarbonate de sodium (1 M, pH 8.3), un tube de réaction, une colonne de centrifugation avec un filtre de 0.2 µM (Nanosep®) et une résine de purification (Bio-Gel® P-6) resuspendue dans du PBS 1X (pH 7.4). Le marquage est réalisé suivant le protocole du kit Invitrogen : l'Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling Kit (réf. A30009).

Pour connaitre, le volume de fluorophore nécessaire au marquage, il est nécessaire d'utiliser la formule suivante (Équation 2-1) :

$$Volume\ d'AlexaFluor647\ (\mu L) = \frac{\left[1000 * \frac{m_{protéine}}{MM_{protéine}}\right] * MR}{7.94} \qquad \text{Équation 2-1}$$

Où $m_{protéine}$ est la quantité de protéine à marquer en µg, $MM_{protéine}$ est la masse molaire de la protéine en Da et MR est le ratio entre le fluorophore et la protéine à marquer. Le MR est déterminé suivant la MM de la protéine et le degré de marquage souhaité (DOL).

La réaction de marquage s'effectue pendant 15 minutes à température ambiante avec 20 à 100 µL de protéine à 1 mg/mL, le volume nécessaire de fluorophore calculé grâce à l'équation précédente et 0.1 M de bicarbonate de sodium final. La solution de marquage est ensuite déposée sur la colonne de centrifugation contenant la résine de purification et centrifugée pendant 1 minute à 16 000 x g. Ainsi, les fluorophores n'ayant pas réagit avec la protéine sont retenus dans les pores de la résine afin d'être éliminés.

Enfin, en mesurant au spectrophotomètre UV-visible (SAFAS) les absorbances à 280 et 650 nm de la solution contenant la protéine non marquée (1 mg/mL) et celle contenant la protéine marquée, la concentration de la protéine marquée est obtenue ainsi que le degré de marquage de la protéine (DOL) (Équation 2-2 et Équation 2-3).

$$[protéine] = \frac{A_{280} - 0.03A_{650}}{A_{280\ (protéine\ \text{à}\ 1mg/mL)} * MM_{protéine}} \qquad \text{Équation 2-2}$$

$$DOL = \frac{A_{650}}{\varepsilon_{Alexa647} * [protéine]} \qquad \text{Équation 2-3}$$

Où [protéine] est la concentration de la protéine en M ; A_{280} et A_{650} sont respectivement l'absorbance de la protéine marquée à l'Alexa647 à 280 et 650 nm ; $A_{280\ (\text{protéine 1mg/mL})}$ est l'absorbance de la protéine non marquée à 1 mg/mL ; le facteur 0.03 est le facteur de correction de la contribution de l'absorbance à 280 nm du fluorophore et enfin $\varepsilon_{Alexa647}$ est le coefficient d'extinction molaire de l'Alexa647 (239 000 $cm^{-1}M^{-1}$).

2.4.1.2. Electrophorèses en conditions natives et dénaturantes

Afin de vérifier l'effet du marquage sur la lectine, des électrophorèses en conditions natives et dénaturantes peuvent être faites. L'électrophorèse native sur gel de polyacrylamide (PAGE) est utilisée pour séparer des biomolécules en fonction de leur taille et de leur charge comme les protéines. Le gel d'acrylamide est plus ou moins réticulé en fonction du pourcentage d'acrylamide et de la taille de la protéine à analyser. Il est plongé dans un tampon de migration conducteur et les solutions de protéines (préalablement mises dans un tampon de charge) sont ajoutées dans les puits du gel. En fonction du pH du tampon de migration et du pI (point isoélectrique) des protéines, celles-ci sont chargées positivement ou négativement et elles migrent alors respectivement soit vers la cathode soit vers l'anode. Le pH du tampon de migration est en générale choisi pour être supérieur au pI des protéines, ainsi elles sont chargées négativement et migrent vers l'anode. En conditions natives (PAGE), plus les protéines sont petites et chargées négativement, plus elles migreront rapidement dans le gel. L'électrophorèse PAGE donne accès à l'état natif et donc à l'état de multimérisation de la protéine. Pour séparer les protéines qu'en fonction de leur taille, un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes est réalisé (SDS-PAGE). Les protéines sont traitées avec un tampon de charge dénaturant (tampon de Laemmli) contenant du SDS et du β-mercaptoéthanol permettant de donner une charge négative globale identique entre les protéines et de réduire les ponts disulfures. En comparant avec un marqueur de poids moléculaire, l'électrophorèse SDS-PAGE donne accès au poids moléculaire de la protéine (Figure 2-5).

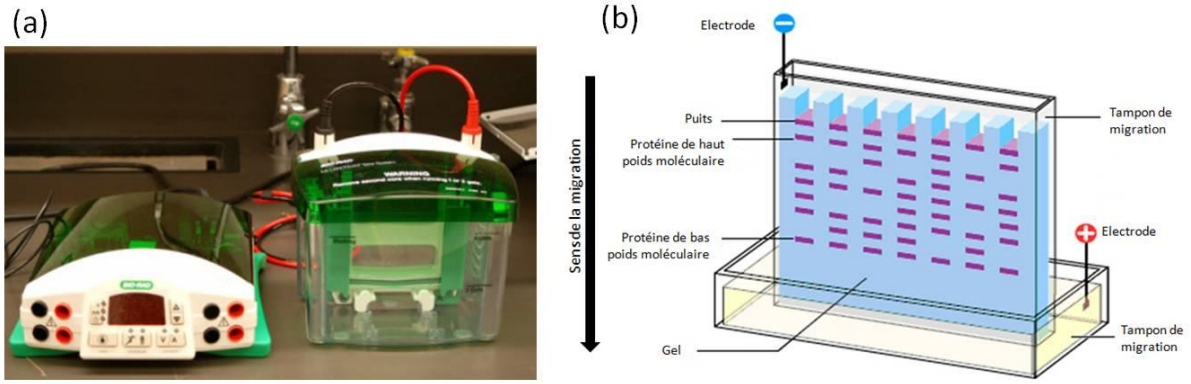


Figure 2-5 : Photo de l'appareillage nécessaire pour réaliser une électrophorèse sur gel (a) et représentation schématique du fonctionnement d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (b).

Afin de réaliser une électrophorèse, il est nécessaire de préparer des gels de polyacrylamide contenant deux taux de réticulation différents : un gel de séparation et un gel de concentration où les puits sont présents. Le gel de concentration est un gel de faible réticulation (5 % d'acrylamide) permettant de concentrer les protéines pour qu'elle commence leur migration en même temps dans le gel de séparation. Pendant cette thèse, il a été préparé des gels de séparation à 8 % d'acrylamide pour l'analyse de protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 50 kDa et de 15 % pour celles inférieures à 50 kDa (cf. Annexe C1). Le tampon de migration utilisé est un tampon à pH 8.3 contenant 25 mM de Tris Base, 250 mM de glycine et 0.1 % de SDS pour les électrophorèses SDS-PAGE.

Pour les électrophorèses natives (PAGE), une solution de 10 µL de protéines (0.1 mg) est mélangée à 2 µL de tampon de charge (0.313 M TrisBase, 50 % glycerol, 0.5 g/L bleu de bromophénol) avant d'être chargée dans un puits du gel. Pour les électrophorèses dénaturantes (SDS-PAGE), une solution de 10 µL de protéines (0.1 mg) est mélangée à 2 µL de tampon laemmli, puis portée pendant 3 minutes à 100 °C avant d'être chargée dans un puits du gel. La migration se fait à 80 Volt dans le gel de concentration puis 150 volts dans le gel de séparation. Un marqueur de poids moléculaires est ajouté dans un des puits (PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, Thermo scientific). A la fin de la migration, une photo du gel d'électrophorèse est prise avec l'appareil imageur IS4000M de KODAK avec un filtre d'excitation à 635 nm afin de visualiser le marquage des protéines. Une coloration au nitrate d'argent est ensuite utilisée pour colorer toutes les protéines présentes dans le gel (cf. Annexe C2).

2.4.2. Test par compétition pour le criblage de la bibliothèque de sucres

Le glycocluster-microarray a notamment été utilisé pour cribler la bibliothèque d'oligosaccharides et polysaccharides provenant de l'OligoTech® de la société Elicityl. Pour cela, trois glycoclusters de référence ont été immobilisés et mis en compétition avec les sucres en solution pour lier la lectine testée. Deux lectines ont été testées : PA-IL et PA-IIL (Réf. Lec102 et Lec101, Elicityl) (cf. Chap. 4)

2.4.2.1. Choix des glycoclusters de référence

Les trois glycoclusters de référence choisis présentent des affinités différentes pour les lectines testées, ils ont une affinité pour celles-ci, faible, moyenne ou forte (G_{faible}, G_{moyen} et G_{fort}). Ainsi, pour un sucre présentant qu'une faible affinité pour la lectine testée, une compétition ne sera observable qu'avec le glycocluster présentant une faible affinité pour la lectine (G_{faible}).

Le choix des trois glycoclusters dépend aussi de la lectine testée, ainsi pour PA-IL il s'agit de trois galactoclusters et pour PA-IIL, trois fucoclusters (Tableau 2-7). Les trois glycoclusters choisis par criblage (PA-IL ou PA-IIL) possèdent des séquences d'ADN (zip) différentes permettant leur immobilisation au sein d'un même micropuits. Les conditions d'immobilisation sont détaillées dans le paragraphe 2.3.4 et une répétition de 16 spots du même glycocluster est faite par puits (48 spots par puits sont réalisés).

	Criblage avec PA-IL	**Criblage avec PA-IIL**
$\mathbf{G_{faible}}$	$(\text{Pe-MTz EG}_3\text{-Gal}_2)_2^{1+}$	$(\text{Pe-MTz EG}_3\text{-Fuc}_2)_2$
$\mathbf{G_{moyen}}$	$(\text{DMCH-MTzEG}_3\text{-Gal})_4$	$\text{Man(proTz EG}_3\text{-Fuc)}_8$
$\mathbf{G_{fort}}$	$\text{Man(proTzAcNPh-Gal)}_4$	$\text{Xylo(EG}_2\text{MTz EG}_3\text{-Fuc)}_3$

Tableau 2-7 : Glycoclusters de référence choisis pour le criblage vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL.

2.4.2.2. Criblage de la bibliothèque d'oligosaccharides et polysaccarides

Les sucres issus de l'OligoTech® sont ensuite criblés sur le microarray vis-à-vis de leur affinité pour PA-IL ou PA-IIL. L'effet inhibiteur de chaque sucre sur l'interaction lectin/glycocluster de référence est déterminé avec quatre concentrations en sucre de 1, 10, 100 et 1000 µM pour le crible avec PA-IL et de 0.1, 1.0, 5.0 et 15 µM pour PA-IIL. Pour les polysaccharides (alginates, galacturonanes, glucanes, mannanes, ulvanes, xylanes) dont la masse molaire n'est pas connue, les concentrations testées sont de 0.005, 0.05, 0.5 et 5 mg/mL pour le crible avec PA-IL et 0.5, 2.5, 5.0 et 7.5 mg/mL pour PA-IIL. Des solutions contenant la lectine marquée ($[\text{lectine}]_f$ = 0.12 µM), la BSA ($[\text{BSA}]_f$ = 2 %), du $CaCl_2$

([$CaCl_2$]$_f$ = 7.5 µM) et le sucre à une des quatre concentrations choisies sont préparées dans du PBS 1X (pH 7.4) grâce au robot TECAN Freedom EVO 100. Pour chaque concentration de sucre testée, 1.5 µL de solution est déposée sur un micropuits. Ainsi, pour un microarray de 40 puits, jusqu'à 10 sucres peuvent être testés. La compétition entre le sucre et les glycoclusters pour lier la lectine se fait ensuite pendant 3 heures à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.02% pendant 5 minutes à 4°C puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché en centrifugeant. Le microarray est ensuite scanné aux longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et de 635 nm, afin de détecter respectivement les Cy3_glycoclusters et l'Alexa647_lectine (Figure 2-6).

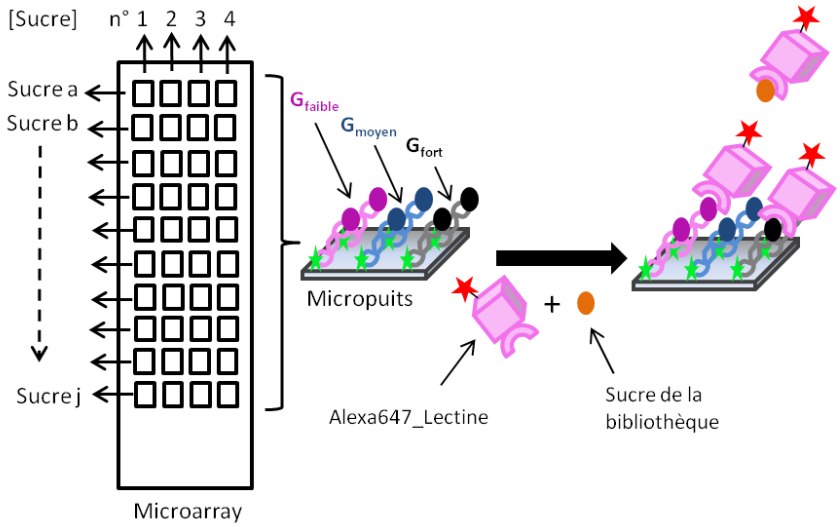


Figure 2-6 : Schéma explicatif du criblage de la bibliothèque de sucres grâce au glycocluster-microarray.

2.4.3. Criblage de la bibliothèque de glycoclusters

Le glycocluster-microarray permet aussi de cribler la bibliothèque de glycoclusters synthétisés par nos collègues de l'IBMM de Montpellier. Pour cela, la moyenne des intensités de fluorescence du complexe glycocluster/lectine (FI_{635}) est mesurée et permet de faire une analyse qualitative de leur force d'interaction. Plus la FI_{635} est élevée, plus l'interaction du glycocluster avec la lectine est forte. La comparaison de ces FI_{635} permet de déterminer parmi plusieurs glycoclusters immobilisés sur le même microarray, quels sont ceux présentant le plus d'affinité pour la lectine.

Pour cela, 1.5 µL d'une solution contenant 0.12 µM de lectine, 2 % de BSA et 7.5 µM de $CaCl_2$ est déposée sur chacun des micropuits. Des solutions en absence ou non de $CaCl_2$ et de BSA avec 0.5 ou 2.5 µM de lectine sont aussi testées pour lectines issues du flagelle (FliC et

FliD) et des *pili* (PilA, PilY1 et CupB6) de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces lectines ont été produites par notre collègue, le Dr. Olivier Vidal de l'UGSF de Lille. La reconnaissance glycocluster/lectine se fait ensuite pendant 3 heures à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.02% pendant 5 minutes à 4°C puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché en centrifugeant. Enfin, le microarray est scanné aux longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et de 635 nm afin de détecter respectivement les Cy3_glycoclusters et l'Alexa647_lectine.

Une détection indirecte de l'interaction lectine/glycocluster a aussi été réalisée pour la lectine FliD en utilisant un anticorps anti-FliD produit chez le lapin et marqué à l'Alexa647. Cet anticorps nous a été fourni par notre collègue, le Dr. Olivier Vidal de l'UGSF de Lille. Pour cela, FliD non marquée à 0.5 µM est incubée avec les glycoclusters immobilisés sur le microarray. Cette étape de reconnaissance suit le même protocole qu'expliqué précédemment. Des solutions d'anticorps anti-FliD marqué à l'Alexa647 à 0.1 ou 0.5 µM sont préparées dans du PBS1X-T0.02% et 1.5 µL est déposé par micropuits. L'incubation se fait pendant une heure à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.02% pendant 5 minutes à 4°C puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché en centrifugeant. Le microarray est scanné aux longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et de 635 nm.

Enfin, pour pallier au marquage de l'anticorps anti-FliD et amplifier le signal de fluorescence, il a été testé l'utilisation d'un anticorps secondaire polyclonal commerciale marqué à l'Alexa647 et dirigé contre l'anticorps anti-FliD (Goat Anti-Rabbit IgG Alexa647, Réf. Ab150079, abcam). Pour cela, FliD non marquée (0.5 µM) et l'anticorps anti-FliD non marqué (0.1 ou 0.5 µM) sont déposés sur le microarray suivant le même protocole décrit précédemment. Des solutions d'anticorps secondaires marqués à l'Alexa647 à 0.01 ou 0.5 µM sont préparées dans du PBS1X-T0.02% et 1.5 µL est déposé dans les micropuits possédant respectivement 0.1 et 0.5 µM d'anticorps anti-FliD. L'incubation se fait pendant une heure à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.02% pendant 5 minutes à 4°C puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché en centrifugeant. Le microarray est ensuite scanné aux longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et de 635 nm.

2.4.4. Caractérisation de l'interaction glycocluster/lectine

Les meilleurs candidats glycoclusters estimés par le criblage de la bibliothèque de glycoclusters sur le microarray sont ensuite caractérisés par une mesure d'IC_{50} et de K_d pour quantifier leur interaction avec la lectine (Goudot et al., 2013; Zhang et al., 2009a) (Figure 2-7).

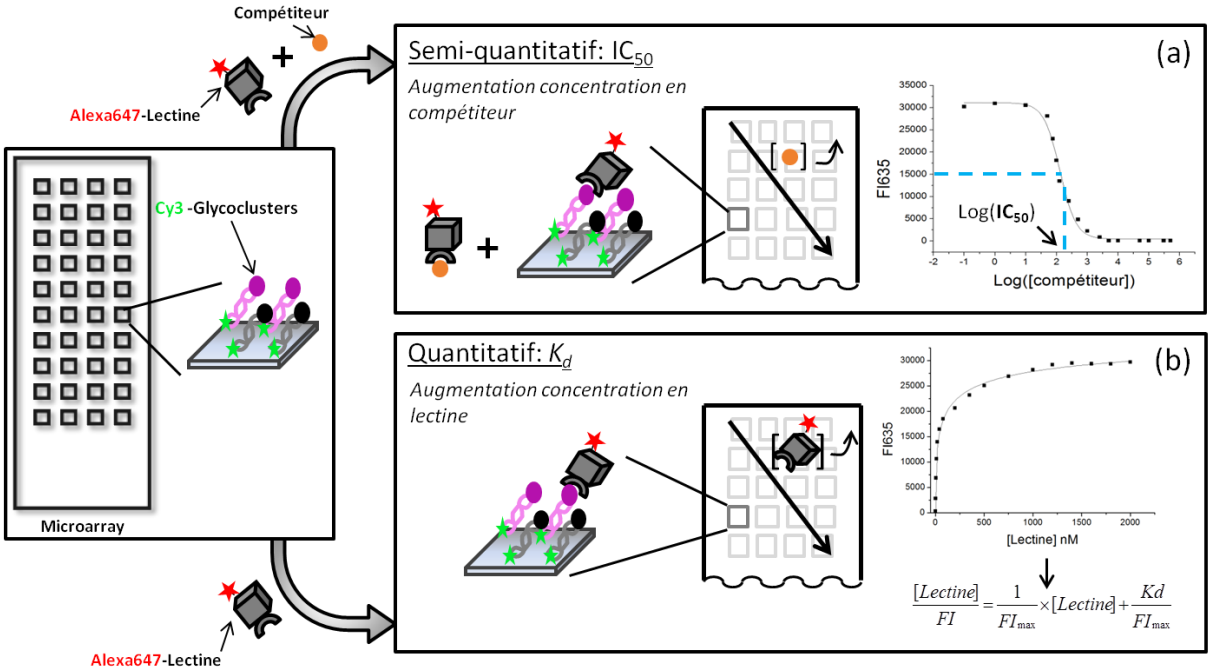


Figure 2-7 : Schéma explicatif de la caractérisation de l'interaction glycocluster/lectine par la mesure d'IC_{50} (a) et de K_d (b).

2.4.4.1. Evaluation de l'IC_{50} : analyse semi-quantitative

La mesure d'IC_{50} nécessite d'utiliser un sucre compétiteur du glycocluster pour lier la lectine. Dans le cas de la lectine PA-IL, le sucre compétiteur est le lactose et pour PA-IIL, il s'agit du fucose. Une concentration croissante de compétiteur est ajoutée d'un puits à l'autre du microarray afin d'obtenir une courbe d'inhibition en traçant la moyenne des intensités de fluorescence du complexe glycocluster/lectine (FI_{635}) en fonction du logarithme de la concentration en compétiteur. De cette courbe est déduite la valeur d'IC_{50}, qui représente la concentration en compétiteur nécessaire pour déplacer 50 % de l'interaction maximale glycocluster/lectine. Ainsi, plus la valeur d'IC_{50} est élevée, plus l'interaction glycocluster/lectine est forte (Figure 2-7a).

Pour réaliser un IC_{50}, 20 concentrations de compétiteurs sont utilisées (Tableau 2-8). Par conséquent, 20 solutions contenants la lectine marquée ($[lectine]_f$ = 0.12 µM), la BSA ($[BSA]_f$ = 2 %), du $CaCl_2$ ($[CaCl_2]_f$ = 7.5 µM), et le compétiteur à différentes concentrations sont préparées dans du PBS 1X (pH 7.4) grâce au robot TECAN Freedom EVO 100. Il est

ensuite déposé 1.5 µL de chaque solution sur les micropuits du microarray. La compétition entre le glycocluster et le compétiteur pour lier la lectine se fait ensuite pendant 3 heures à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.02% pendant 5 minutes à 4°C puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché en centrifugeant. Enfin, le microarray est scanné aux longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et de 635 nm.

Micropuits	[lactose] final (µM)	[Fucose] final (µM)
1	0	0
2	0,00001	0,00001
3	0,0001	0,0001
4	0,001	0,001
5	0,01	0,01
6	0,1	0,1
7	1	0.5
8	10	1
9	50	10
10	100	50
11	500	100
12	1000	500
13	2500	1000
14	5000	2500
15	7500	5000
16	10000	7500
17	25000	10000
18	50000	25000
19	100000	50000
20	250000	75000

Tableau 2-8 : Gradient de concentration en compétiteur utilisé pour réaliser un IC_{50}.

Les valeurs d'IC_{50} sont déterminées grâce au logiciel « BioDataFit 1.02 » avec le modèle sigmoïdal (LogEC50) (Équation 2-4):

$$FI = FI_{min} + \frac{(FI_{max} - FI_{min})}{1 + 10^{[compétiteur]/[IC50]}} \qquad \text{Équation 2-4}$$

Où FI est la fluorescence du complexe glycocluster/lectine (FI_{635}) pour une concentration donnée de compétiteur ([compétiteur]). FI_{min} et FI_{max} sont respectivement, la fluorescence minimale et maximale du complexe glycocluster/lectine.

2.4.4.2. Evaluation du K_d : analyse quantitative

La mesure de K_d sur microarray permet de quantifier l'interaction glycocluster/lectine, il s'agit d'un K_d de surface. Il est réalisé en augmentant la concentration en lectine d'un micropuits à l'autre du microarray afin de tracer une isotherme. La constante de dissociation

(K_d) du complexe glycocluster/lectine est ensuite déterminée par une régression linéaire. Plus le K_d est petit, plus l'interaction glycocluster/lectine est forte (Figure 2-7b).

Pour réaliser un K_d, 20 concentrations de lectines sont utilisées (Tableau 2-9). Par conséquent, 20 solutions contenants la BSA ($[BSA]_f$ = 2 %), du $CaCl_2$ ($[CaCl_2]_f$ = 7.5 µM), et la lectine à différentes concentrations sont préparées dans du PBS 1X, pH 7.4 grâce au robot TECAN Freedom EVO 100. Il est ensuite déposé 1.5 µL de chaque solution sur les micropuits du microarray. La reconnaissance glycocluster/lectine se fait ensuite pendant 3 heures à 37 °C dans une atmosphère saturée en eau et protégée de la lumière. Le microarray est ensuite lavé avec une solution de PBS1X-T0.02% pendant 5 minutes à 4°C puis rincé avec de l'eau ultrapure et séché en centrifugeant. Enfin, le microarray est scanné aux longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et de 635 nm.

Micropuits	[PA-IL] final (nM)	[PA-IIL] final (nM)
1	0,01	1
2	0,1	10
3	1	50
4	5	80
5	10	100
6	20	150
7	40	200
8	60	300
9	80	400
10	100	500
11	200	600
12	350	800
13	500	1000
14	750	1200
15	1000	1400
16	1200	1600
17	1400	1800
18	1600	2000
19	1800	2200
20	2000	2400

Tableau 2-9 : Gradient de concentration en lectine utilisé pour réaliser un K_d.

Les valeurs de K_d sont déterminées grâce à la méthode décrite par Kuno *et al*. permettant de tracer des isothermes d'interaction et d'obtenir la valeur du K_d grâce à la régression linéaire suivante (Kuno et al., 2005; Park and Shin, 2007) (Équation 2-5) :

$$\frac{[Lectine]}{FI} = \frac{1}{FI_{max}} * [lectine] + \frac{Kd}{FI_{max}} \qquad \text{Équation 2-5}$$

Où FI est la moyenne des intensités de fluorescence du complexe glycocluster/lectine (FI_{635}) pour une concentration donnée de lectine ([lectine]) et FI_{max} est la fluorescence maximale du

complexe glycocluster/lectine. Avec cette méthode, la concentration de lectine doit être en excès par rapport à celle du ligand et FI_{max} la capacité maximale de liaison engendrée par les glycoclusters immobilisés sur le microarray vis-à-vis de la lectine. L'Annexe D présente la théorie permettant d'obtenir la régression linéaire.

2.4.5. Lecture de fluorescence

Afin de contrôler, l'immobilisation des glycoclusters sur la lame de verre microstructurée, une lecture de la fluorescence à 532 nm du fluorophore Cy3 couplé au glycocluster est effectuée. Cette lecture de fluorescence est effectuée avant l'ajout de la Alexa647_lectine afin d'éviter le phénomène d'extinction par le fluorophore Alexa647 (cf. 1.4.2.3). D'autre part, afin de mesurer l'interaction entre les glycoclusters et la lectine, une lecture de fluorescence à 635 nm du fluorophore l'Alexa647 greffé à la lectine est également réalisée. Pour cela, les glycocluster-microarrays sont scannés grâce au scanner pour biopuce GenePix 4100A (Axon Instruments, Sunyvale, USA) et analysés avec le logiciel GenePix Pro 6.0.

Pour rappel, grâce au spotter, des spots d'ADN ont été déposés sur le microarray permettant d'immobiliser, par hybridation d'ADN, les glycoclusters et ensuite permettre l'interaction avec la lectine (cf. 2.3.3 et 2.3.4). Pour l'analyse, les spots ont été définis comme étant circulaires avec un diamètre de 100 µm et distants les uns des autres de 150 µm. 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 un glycocluster donné, le signal de fluorescence a été obtenu en faisant la moyenne des intensités de fluorescence de chacun des spots constitués de ce glycocluster que ce soit pour le signal à 532 nm que celui à 635 nm (FI_{532} et FI_{635} respectivement). Enfin, bien que l'homogénéité intra et inter-spot soit très bonne grâce à la technique de spotting par piezoélectricité, au contrôle de l'humidité ainsi qu'au taux d'hybridation similaires des différents ADNs utilisés, il est possible de corriger la moyenne des intensités de fluorescence à 635 nm émises par la lectine interagissant avec le glycocluster par celles à 532 nm émises par le glycocluster seul afin de normaliser les résultats en fonction de la densité de surface de chaque glycoclusters.

2.4.6. Recyclage des microarrays

A la fin d'une série d'expérience, les glycocluster-microarray sont recyclés afin de pouvoir les utiliser de nouveau. Par série de 40 lames microstructurées, les lames sont placées dans un bain d'eau ultrapure avec 0.5 % du détergent TDF4 pendant une nuit. Les lames sont ensuite

lavées 3 fois avec de l'eau ultrapure, puis placées dans une solution de piranha (35 % H_2O_2/97 % H_2SO_4 ; 1:2, v/v) pendant 30 minutes dans un bain à ultrasons. Puis, les lames sont lavées avec de l'eau ultrapure jusqu'à atteindre un pH neutre et séchées à la centrifugeuse. Les lames sont ensuite traitées avec un piranha basique (35 % H_2O_2/30 % NH_3/H_2O ; 1:1:5, v/v/v) pendant une heure à 100 °C. Elles sont rincées à l'eau ultrapure afin d'atteindre un pH neutre, puis séchées à la centrifugeuse. Les lames sont ensuite plongées pendant 3 minutes dans la solution de gravure « BOE » (cf. 2.3.1) puis rincées avec de l'eau ultrapure et séchées à la centrifugeuse. Les lames sont ainsi prêtes pour reprendre le cycle de production des glycocluster-microarrays à partir du paragraphe 2.3.2.

Chapitre 3

Validation de l’outil glycocluster-microarray : Impact de la densité de surface

3. Validation de l'outil glycocluster-microarray : Impact de la densité de surface

Dans le cadre de cette thèse, il est, notamment, développé un glycocluster-microarray afin de cribler une bibliothèque de glycoclusters et de caractériser leur interaction avec des lectines de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL, PA-IIL, FliC, FliD, PilA, PilY1 et CupB6) par des mesures d'IC_{50} et de K_d (cf. Chap. 5). Pour évaluer la fiabilité de ces mesures et notamment la possibilité de comparer les résultats entre les différents glycoclusters et les différents microarrays utilisés, l'impact de la densité de surface en glycocluster a été étudié. Pour ce faire, nous avons étudié les variations d'IC_{50} et de K_d en fonction de la densité de surface en glycocluster.

Il va donc être présenté la méthode choisie pour faire varier la densité en glycoclusters. Puis, afin d'évaluer la densité de surface en glycocluster, ainsi que leur organisation de surface, il sera présenté une étude AFM. Enfin, nous présenterons la variation d'IC_{50} et K_d pour deux galactoclusters immobilisés à différentes densités et présentant une forte (K_d = 60 nM) et une faible (K_d = 400 nM) affinité pour PA-IL. Ces résultats ont été publiés dans (Dupin et al., 2015).

Avant de discuter de ces résultats, il va être rappelé l'importance du choix du mode d'immobilisation de la sonde sur le microarray (ici, glycocluster) ainsi que ce qu'est l'effet cluster de surface.

3.1. Contexte bibliographique

Dans le chapitre 1 (cf. 1.4.2), il a été mentionné l'importance du choix du mode d'immobilisation de la sonde (sucre ou ligand multivalent) sur la surface du microarray pour optimiser la reconnaissance avec la cible (lectine).

Afin d'avoir une présentation optimale de la sonde pour la cible, il est nécessaire que l'immobilisation réponde à au moins trois critères qui sont :

- Une immobilisation robuste permettant le maintien de la sonde sur le microarray pendant toutes les étapes du protocole de reconnaissance avec la lectine.
- Une immobilisation orientée de la sonde sur la surface permettant le maintien de son activité biologique et son accessibilité pour la cible.
- Une immobilisation contrôlée de la sonde sur la surface permettant une immobilisation homogène à une certaine densité de surface (Contrôle de la distance inter-sondes sur la surface).

Ce troisième critère, et plus précisément la densité de surface en sucre simple monovalent, a fait l'objet de nombreuses études. De manière générale, ces études ont toutes montré que la densité de sucres immobilisés sur une surface influençait grandement leurs interactions avec les lectines. Les premières études menées par *Khanes et al.* ont montré qu'immobiliser des sucres sur un support, que ce soit des billes de résine ou une surface d'or, permettait de détecter une interaction avec une protéine. Cependant, il avait été souligné que d'un lot de production à l'autre, du support fonctionnalisé avec le disaccharide Galβ1-3GalNAc (ligand naturel) ou le disaccharide Galα1-3GlcNAc, le niveau d'interaction et la sélectivité de la reconnaissance avec la lectine *Bauhinia purpurea* n'était pas le même. En effet, à faible densité de surface en sucres, la protéine pouvait fortement interagir avec son ligand naturel et peu avec le disaccharide Galα1-3GlcNAc et inversement à forte densité de surface en sucres (Horan et al., 1999; Liang et al., 1997, 1996). Plus récemment, une étude a montré que faire varier la densité de sucres immobilisés à la surface d'un microarray permettait de moduler les profils de reconnaissance de plusieurs sous-classes d'anticorps au sein d'un sérum et ainsi de les différencier et de les identifier (Oyelaran et al., 2009). D'autres groupes ont démontré de manière similaire que les interactions sucre/lectine ou sucre/enzyme étaient influencées par la densité de surface en sucre. (Houseman and Mrksich, 2002, 1999; Lee and Lee, 1995). Par exemple, la quantification de l'interaction sucre/lectine par la mesure de constante de dissociation sur microarray, grâce à l'utilisation de l'imagerie SPR ou de la détection par fluorescence, est influencée par la densité de surface en sucre. En effet, il a été montré par différents groupes qu'augmenter la densité de surface en sucre monovalent avait pour conséquence de diminuer le K_d et donc d'augmenter la force d'interaction sucre/lectine (Godula and Bertozzi, 2012; Liang et al., 2007; Smith et al., 2003; Tian et al., 2012; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2010).

Les interactions sucre/lectine peuvent bénéficier du « cluster glycoside effect » pour augmenter leur interaction (cf. 1.3.2.3). Pour rappel, ce phénomène a lieu entre une lectine possédant plusieurs sites de liaison à un sucre (lectine multivalente) et un ligand multivalent présentant plusieurs sucres capables d'interagir simultanément avec la lectine. Ce phénomène se traduit par l'exaltation de l'affinité par sucre pour une interaction entre une lectine multivalente et un ligand multivalent par rapport à une interaction monovalente lectine/sucre. La manière d'agencer les sucres monovalents ainsi que les ligands multivalents sur une surface peut donc permettre de créer des interactions entre une lectine multivalente et plusieurs ligands immobilisés de manière suffisamment proche les uns des autres sur la surface. Il s'agit de l'effet cluster de surface (« surface cluster effect ») (Figure 3-1).

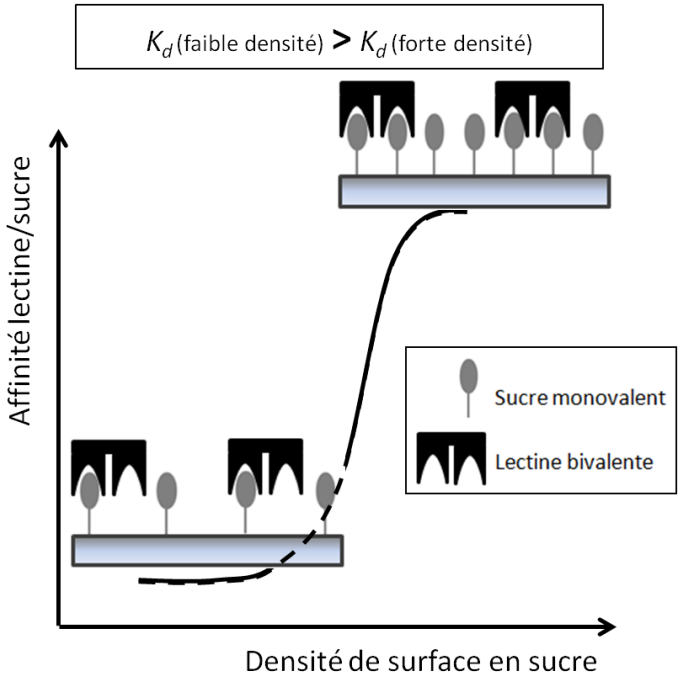


Figure 3-1 : Représentation schématique du « surface cluster effect ».

Il est également important de noter que cet effet peut être dû à la formation d'îlots de sucres à l'échelle nanométrique formant ainsi localement des zones où un effet cluster de surface est possible malgré une densité de surface macroscopique faible.

Contrôler la densité en sondes que ce soit des sucres simples ou des ligands multivalents est donc primordial quelque soit l'application visée :

- Par exemple, dans le cadre de développement d'un test diagnostic, il peut être nécessaire d'optimiser la densité de surface de chacun des sucres afin d'exalter les interactions et ainsi diminuer le seuil de sensibilité du test et permettre l'identification des différentes molécules présentes dans le sérum des patients.

- Dans le cadre de l'utilisation de microarray pour le criblage à haut débit de molécules pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques (« Drug Discovery »), il est aussi très important d'immobiliser de façon reproductible, homogène et avec une même densité de surface les différentes sondes afin de les évaluer de manière identique.

3.2. Choix des glycoclusters

Afin d'étudier l'impact de la densité de surface en glycocluster sur les mesures d'affinité avec une lectine (IC_{50} et K_d) sur le microarray, deux glycoclusters ont été choisis. Ils portent chacun une séquence d'ADN différente permettant leur immobilisation au sein d'un même microarray grâce à leur hybridation avec l'ADN simple brin immobilisé de manière covalente sur le support de verre. Ils possèdent tous les deux un cœur mannose sur lequel est greffé quatre bras portant chacun un résidu galactose pouvant interagir avec la lectine PA-IL. Il s'agit donc de deux glycoclusters, G1 et G2 qui varient par la nature du bras : G1 possède un bras type triéthylène glycol (EG_3) et le glycocluster G2 possède un bras aromatique type phénylacetamide (AcNPh) (Pourceau et al., 2010) (Figure 3-2).

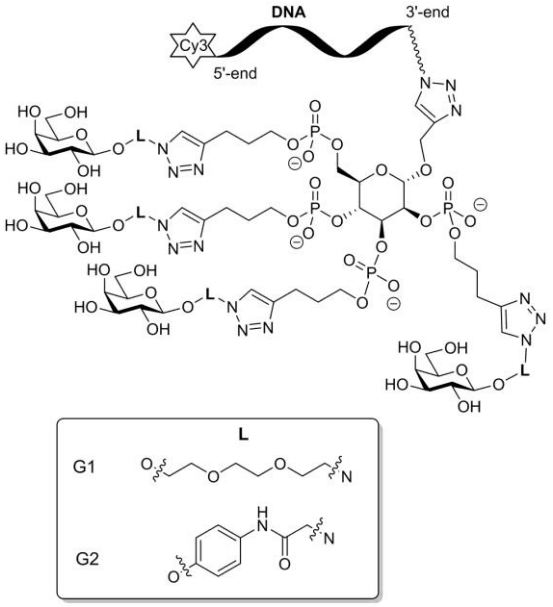


Figure 3-2 : Structures des glycoclusters G1 et G2.

Ces deux glycoclusters, G1 (Man(proTzEG$_3$-Gal)$_4$) et G2 (Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$) sont issus des résultats obtenus durant la thèse du Dr. Alice Goudot où l'analyse de différents galactoclusters avait notamment conduit à la conclusion qu'un galactocluster à cœur mannose présentait la meilleure topologie pour interagir avec PA-IL. De plus, cette interaction était renforcée par l'apport d'un groupement aromatique phényle sur les bras du galactocluster. En

effet, la figure 3-3 présente les résultats de fluorescence de la lectine Alexa647_PA-IL (FI_{635}) interagissant avec les glycoclusters immobilisés par DDI sur le microarray. Les deux témoins négatifs, TN_1 : ADN et TN_2 : $(DMCH\text{-}MTzEG_3\text{-}Man)_3$ correspondent à un ADN simple brin et à un glycocluster présentant trois mannoses. Ils présentent une FI_{635} d'environ 50 u.a. signifiant qu'il n'y pas d'adsorption non spécifique de PA-IL. Le témoin positif, TP_1 : $DMCH\text{-}MTzEG_3\text{-}Gal$, présentant un galactose à une FI_{635} de 981 u.a. ce qui est 20 fois supérieur aux témoins négatifs et montre la spécificité de PA-IL pour le galactose. Enfin, le glycocluster G2 présente une FI_{635} plus élevée d'environ un facteur 5 par rapport au glycocluster G1. Le glycocluster G2 présente donc une bien plus forte affinité pour PA-IL que G1. L'effet de l'apport d'un aglycone aromatique au glycocluster sur l'interaction avec PA-IL sera discuté dans le Chap. 5. Bien que le groupement aromatique phényle augmente fortement l'interaction avec PA-IL, la présence du galactose est essentielle pour cette interaction. En effet, la molécule $Man(ProTzMPh)_4$, molécule tétravalente portant 4 groupements phényles et pas de galactose, possède un niveau de fluorescence à 635 nm de l'ordre de celui des témoins négatifs.

Les deux glycoclusters, G1 et G2, présentent donc, respectivement, une faible (K_d = 400 nM) et une forte affinité (K_d = 60 nM) pour la lectine PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa* (Ligeour et al., 2015b).

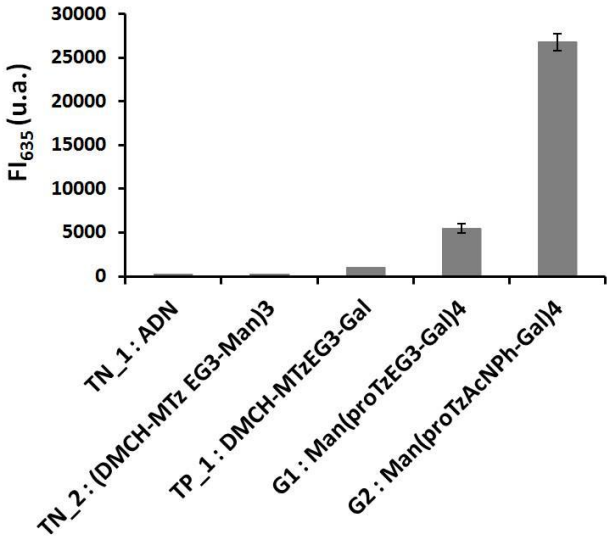


Figure 3-3 : Moyenne des intensités de fluorescence de Alexa647_PA-IL à 635 nm en fonction des glycoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Il sera donc étudié l'impact de la densité de surface en glycocluster sur l'évaluation de l'IC_{50} et du K_d sur microarray et cela pour deux glycoclusters présentant différentes forces d'interaction avec la lectine PA-IL.

3.3. Caractérisation et modulation de la densité de surface en glycocluster

3.3.1. Choix du type de modulation

Afin d'évaluer l'effet de la densité de surface sur les mesures d'affinité glycocluster/lectine effectué sur le microarray, il faut pouvoir moduler la densité de surface en glycocluster sur le microarray. Les glycoclusters sont immobilisés par hybridation d'ADN et leur immobilisation est contrôlée par une lecture de fluorescence à 532 nm, longueur d'onde permettant la détection du fluorophore Cy3 greffé au glycocluster. Deux options s'offrent donc à nous pour moduler la densité de surface en glycocluster :

- En modifiant la densité de surface des brins d'ADN immobilisés de manière covalente : Ceci peut être obtenu en faisant varier les concentrations d'ADN à immobiliser sur le microarray dans la solution de dépôt. Le glycocluster étant immobilisé par hybridation d'ADN, à chaque densité d'ADN immobilisés sur le microarray correspond une densité en glycoclusters.
- En utilisant différentes concentrations de glycoclusters à immobiliser par hybridation d'ADN tout en gardant la même densité de surface d'ADN immobilisés de façon covalente sur le microarray. Dans ce cas, la densité de surface en glycocluster est modulée en faisant varier le taux d'hybridation du glycocluster sur le microarray.

Nous avons décidé de choisir la première option pour obtenir différentes densités de surface en glycoclusters. La raison de ce choix repose sur de précédents résultats obtenus au sein du laboratoire en 2009, où la deuxième option avait été utilisée pour faire varier la densité de surface en glycocluster (Zhang et al., 2009a) (Figure 3-4).

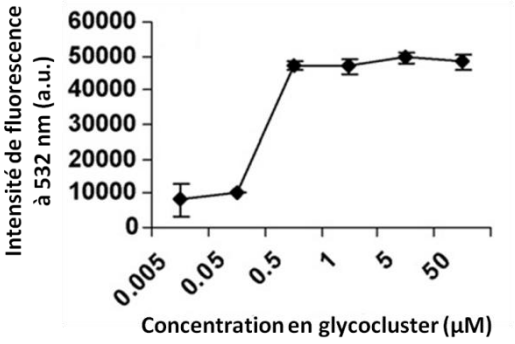


Figure 3-4 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par le Cy3_glycocluster à 532 nm en fonction de la concentration en glycocluster (Zhang et al., 2009a).

Il avait été remarqué que la fluorescence émise par les glycoclusters marqués au Cy3 (FI_{532}) et immobilisés sur le microarray augmentait fortement entre 0.05 µM et 0.5 µM de

glycoclusters pour ensuite atteindre un plateau où la FI_{532} restait constante. Puisque chaque glycocluster porte une molécule du fluorophore Cy3, la FI_{532} permet de se rendre compte de la densité relative en glycoclusters. Cette méthode ne semble cependant pas permettre d'avoir une large gamme linéaire de densités de surface en glycoclusters.

Pour moduler la densité de surface en glycocluster, il a donc été utilisé cinq solutions de dépôt contenant cinq concentrations d'ADN simple brin différentes : 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 10 et 25 µM. Après le spotting de ces solutions de dépôt et l'immobilisation covalente des simples brins d'ADN sur la surface du microarray, les glycoclusters ont été immobilisés par hybridation d'ADN et une lecture de la fluorescence à 532 nm a été effectuée.

La figure 3-5 présente la fluorescence à 532 nm (FI_{532}) émise par les glycoclusters G1 et G2 en fonction de la concentration d'ADN spotté sur le microarray obtenue pour les expériences de mesure d'IC_{50}. La même tendance a été obtenue pour les expériences de mesure de K_d (voir les courbes vertes de la figure 3-11). De plus, pour chaque concentration en ADN simple brin, la FI_{532} correspond à la moyenne de fluorescence de 640 spots (32 spots x 20 puits) dont la variation est de moins de 11 % pour G1 et de moins de 13 % pour G2. Il est observé, pour G1 et G2, que les valeurs de FI_{532} augmentent proportionnellement avec la concentration d'ADN spotté sur le microarray entre 0.1 et 10 µM d'ADN. Il est ensuite atteint un plateau indiquant que la quantité maximum d'immobilisation, par hybridation d'ADN, des glycoclusters sur le microarray a été atteinte.

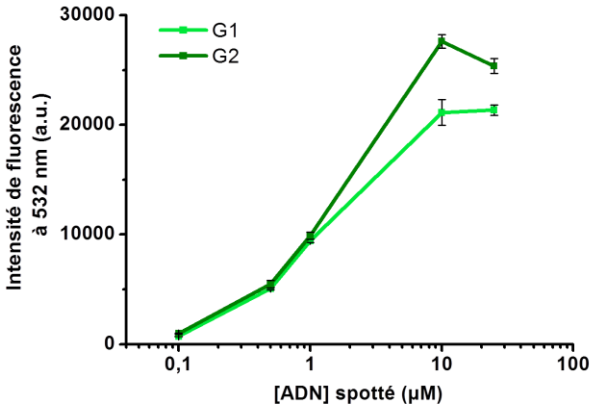


Figure 3-5 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par les Cy3_glycoclusters G1 et G2 à 532 nm en fonction de la concentration en ADN spotté sur le microarray. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 640 répétitions.

En comparant ces résultats (Figure 3-5) avec ceux obtenus en faisant varier la concentration en glycocluster (Figure 3-4), on s'aperçoit que les courbes des deux figures suivent la même tendance. Dans le cas de la variation de la densité de surface en glycocluster grâce à la variation de la concentration en ADN simple brin, l'émission de la FI_{532} par les glycoclusters

semble plus progressive qu'en modulant la concentration en glycocluster. Néanmoins, il peut être noté qu'il n'avait pas été fait de point de mesure de la FI_{532} entre 0.05 et 0.5 µM de glycoclusters. Cependant, il a été obtenu ici, une plus grande gamme linéaire de densités de surface en glycoclusters (entre 0.1 et 10 µM d'ADN simple brin spotté) nous permettant d'évaluer son influence sur les mesures d'affinité lectine/glycocluster sur le microarray (IC_{50} et K_d).

3.3.2. Caractérisation de la surface du glycocluster-microarray par AFM

Nous avons vu que l'effet cluster de surface peut grandement influencer l'affinité d'une sonde pour sa cible. Afin de nous affranchir de cet effet, une étude AFM a été menée avec la plus forte densité de surface en glycoclusters pour permettre de vérifier :

- que l'immobilisation du glycocluster est homogène à l'échelle nanométrique ne permettant pas la formation « d'îlots » de glycoclusters où un effet cluster de surface pourrait se produire,
- que la distance entre deux glycoclusters est suffisamment grande pour qu'un seul glycocluster et non pas deux puisse interagir avec la même lectine.

Cette étude AFM (Atomic Force Microscopy) a été menée par Francesca Zuttion qui est une doctorante du laboratoire dont la thèse est encadrée par le Pr. Magali Phaner-Goutorbe.

3.3.2.1. Principe de l'AFM

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique qui permet de sonder la surface grâce à une pointe nanométrique positionnée à l'extrémité d'un micro-levier flexible (« cantilever ») pouvant se déplacer dans toutes les directions grâce à un scanner piezo électrique. La déflection de la pointe est suivie grâce à la réflexion d'un faisceau laser par le levier sur un système photodiode. L'AFM peut être utilisée en mode de contact ou en modulation d'amplitude (« tapping mode »). En monde de contact, la pointe touche toujours la surface alors qu'en « tapping mode », la pointe oscille près de sa fréquence de résonance sur toute la surface. Dans les deux modes, quand la hauteur de la surface change soit la déflection (en mode de contact) soit l'amplitude d'oscillation (« tapping mode ») du cantilever change. Au lieu de mesurer directement cette déflection ou ce changement d'amplitude d'oscillation du cantilever, les expériences AFM sont, en général, conduites en maintenant ces paramètres constants grâce à une boucle de rétroaction. C'est donc le signal nécessaire à maintenir ces paramètres constants qui est enregistré et qui donne accès indirectement à la topographie de la surface (Figure 3-6).

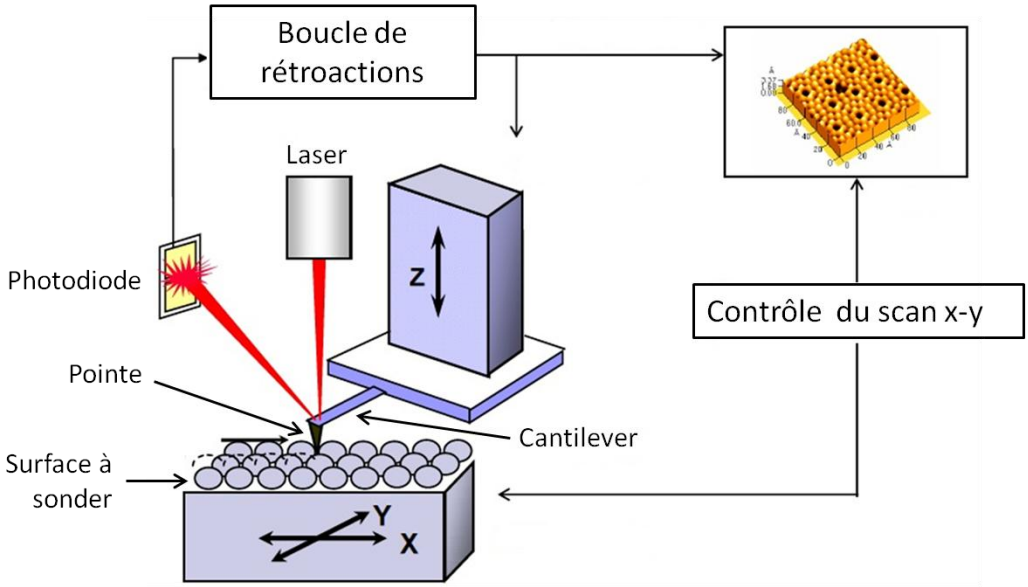


Figure 3-6 : Représentation schématique du principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique (Adapté de http://hosting.umons.ac.be/php/lpsi/fr/microscopie-a-force-atomique)

3.3.2.2. Topographie et densité d'une surface fonctionnalisée avec des glycoclusters

Pour des raisons de rugosité de surface, cette étude a été menée sur SiO_2 (Peak to valley = 0. 4 ± 0.1 nm) et non sur les substrats habituels (Nexterion Glass D, Schott, peak to valley = 1.5 ± 0.2 nm) (Phaner-Goutorbe et al., 2011). Nous avons travaillé avec la plus forte concentration en ADN simple brin (25 µM) et le glycocluster présentant la plus grande affinité pour PA-IL (glycocluster G2). Le glycocluster a été immobilisé par hybridation d'ADN et son immobilisation sur la surface a été vérifiée par une lecture de fluorescence à 532 nm puisque chaque glycocluster possède un fluorophore Cy3.

Des images AFM de cette surface ont été réalisées dans l'air et en milieu liquide avec respectivement, une modulation d'amplitude (« tapping mode ») et un mode de contact. Aucune différence dans la topographie de la surface n'a été observée entre les deux modes. La figure 3-7 présente des images AFM représentatives de l'ensemble des images analysées.

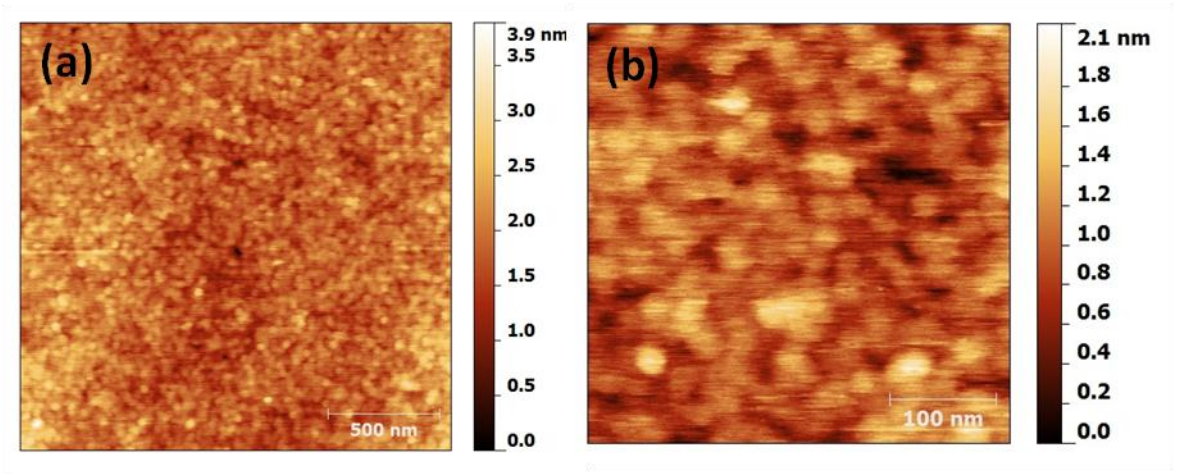


Figure 3-7 : Images AFM de l'immobilisation du glycocluster G2 sur une surface de SiO_2 par DDI en utilisant 25 µM d'ADN immobilisé de façon covalente. La taille des images sont de 2 x 2 μm^2 (a) et de 400 x 400 nm^2 (b).

Sur ces images des grains sont observés, ils ont été attribués à la présence des glycoclusters. La densité de surface de ces grains a été obtenue en les comptant sur différentes images et en en faisant la moyenne. Ainsi, il a été obtenu une densité de surface de $4\text{-}6.10^{10}$ grains.cm^{-2}. De manière similaire, Lallemand *et al.* avaient évalué par AFM sur ce même type de substrat, mais avec une silanisation par imprégnation (taux de greffage covalent de l'ADN simple brin supérieur de 50 % par rapport à la phase gaz), la densité d'ADN double brin à environ 10^{11} molécules.cm^{-2} (Lallemand et al., 2007). Néanmoins, l'objet observé (glycocluster) a une dimension inférieure au rayon de courbure de la pointe, ce qui signifie qu'il y a un phénomène de convolution entre la pointe et l'objet et que celle-ci n'arrive pas à séparer deux objets. C'est pourquoi la possibilité d'avoir deux glycoclusters par grains ne peut pas être exclue. Cependant, Dugas *et al.* ont estimé la densité d'ADN hybridé par radio marquage (ADN radiomarqué au P^{32}) sur des substrats avec des protocoles de greffage et d'hybridation similaires aux nôtres. Leurs résultats donnaient une estimation de $1\text{-}4.10^{10}$ ^{32}P-ADN hybridés.cm^{-2} (Dugas et al., 2004). Ceci tendrait à indiquer que chaque grain correspondrait en moyenne à un glycocluster plutôt que deux. Enfin, les images AFM obtenues montrent toutes que la surface est homogène en glycoclusters, et que la formation « d'îlots » de glycoclusters n'est pas observée. La distance entre deux glycoclusters est donc de 46 nm ce qui est bien supérieure aux dimensions de la lectine PA-IL (3.2 x 7.1 nm) (Sicard et al., 2012) (Figure 3-8).

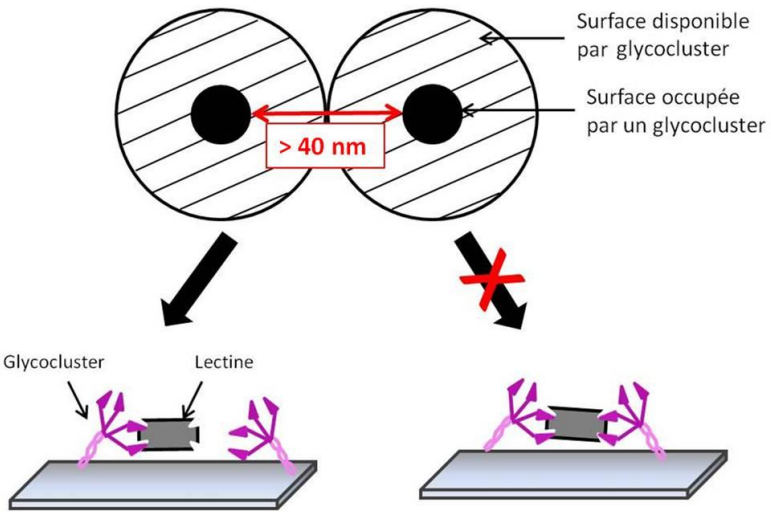


Figure 3-8 : Représentation schématique de la distance entre deux glycoclusters ne permettant pas d'effet cluster de surface.

L'immobilisation par DDI des glycoclusters permet donc d'avoir une immobilisation homogène de ceux-ci sur la surface avec une distance entre les glycoclusters supérieure aux dimensions de PA-IL et donc d'exclure un effet cluster de surface. Ainsi, le glycocluster-microarray nous permet bien d'évaluer le gain d'affinité obtenu grâce à l'effet cluster apporté par la multivalence du glycocluster en lui-même.

3.4. Impact de la densité de surface en glycocluster sur les mesures d'IC_{50} et de K_d

Il va donc maintenant être vérifié l'impact de la densité de surface en glycocluster sur des mesures d'IC_{50} et K_d avec le glycocluster-microarray afin de s'assurer de la fiabilité des mesures.

3.4.1. IC_{50} = f(densité de surface)

Les valeurs d'IC_{50} sont obtenues grâce à un test de compétition entre le glycocluster immobilisé sur le microarray et le lactose libre en solution pour interagir avec la lectine PA-IL. La valeur d'IC_{50} représente la concentration de lactose nécessaire pour diminuer de 50 % le signal de fluorescence à 635 nm émis par la lectine (FI_{635}) lorsqu'elle interagit avec le glycocluster immobilisé sur le microarray en l'absence de lactose (cf. 1.4.3.2). Pour rappel, plus la valeur d'IC_{50} est grande, plus l'interaction glycocluster/lectine est forte. Pour chaque densité de surface en glycoclusters, G1 et G2, une courbe d'IC_{50} a été obtenue (Tableau 3-1).

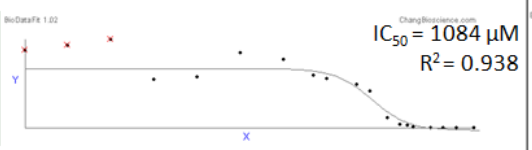
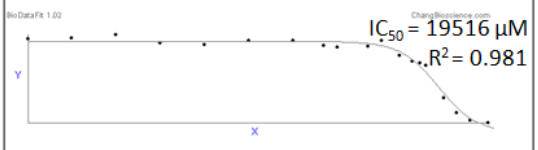
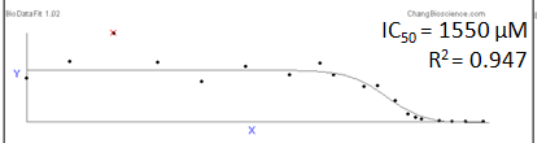
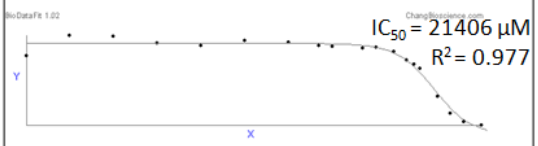
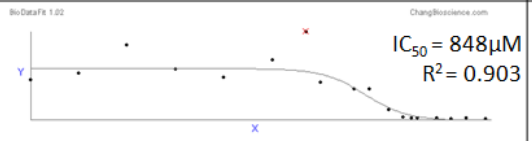
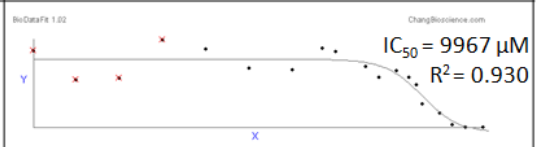
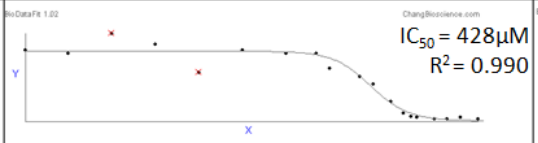
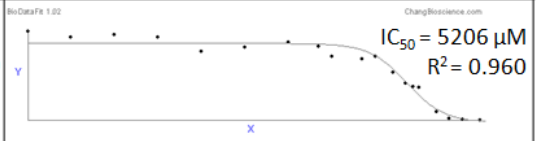
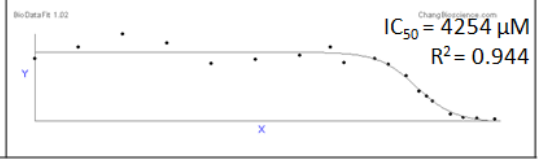
[ADN] spotté (µM)	Glycocluster G1	Glycocluster G2
25		
10		
1.0		
0.5		
0.1	Ø FI_{635} trop basse	

Tableau 3-1 : Courbes d'IC_{50} obtenues pour les glycoclusters G1 et G2 et chaque densité de surface relative en glycoclusters avec le logiciel « BioDataFit 1.02 ».

Pour toutes les densités de surface en glycoclusters, G1 et G2, il a été possible de calculer une valeur d'IC_{50} à l'exception de la plus faible densité en glycoclusters G1 ([ADN] = 0.1 µM) où les intensités de fluorescence émises par la lectine (FI_{635}) étaient trop basses pour pouvoir construire une courbe d'IC_{50}. Les courbes d'IC_{50} ont été obtenues grâce au modèle sigmoïdal (LogEC50) du logiciel « BioDataFit 1.02 » et avaient toutes un $R^2 > 0.90$ (cf. 2.4.4.1). Il a été montré par Sebaugh que la fiabilité des valeurs d'IC_{50} implique plusieurs pré-requis concernant les données permettant de tracer la courbe d'IC_{50} (Sebaugh, 2011). Une bonne approximation du modèle sigmoïdal nécessite, qu'au moins deux points de données se situent sur les plateaux bas et haut de la sigmoïde ainsi que de part et d'autre du point d'inflexion à 50 %. Comme le montre le tableau 3-1, les courbes d'IC_{50} obtenues avec G1 et G2 sont en accord avec ces pré-requis.

La figure 3-9 met en relation les densités de surface en glycoclusters avec les valeurs d'IC_{50} obtenues pour chacune d'elles. Pour cela, il a été tracé le signal émis à 532 nm par les glycoclusters (en vert) et les valeurs d'IC_{50} obtenues pour chaque densité de surface en

glycoclusters (en rouge) en fonction de la concentration d'ADN simple brin spotté sur le microarray et cela pour le glycocluster G1 et G2.

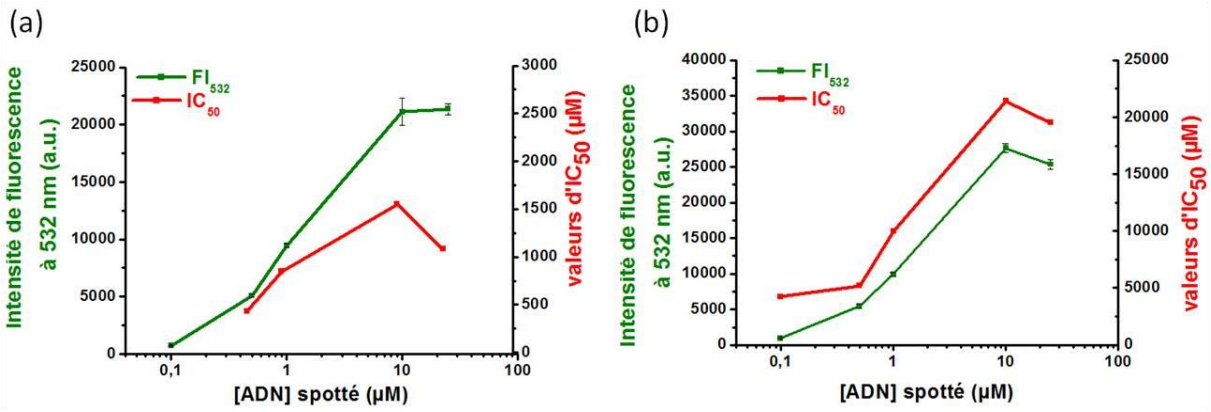


Figure 3-9 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par le Cy3_glycocluster (en vert) et valeurs d'IC_{50} obtenues (en rouge) en fonction de la concentration en ADN spotté pour le glycocluster G1 (a) et le glycocluster G2 (b).

Il est clairement montré, que les valeurs d'IC_{50} suivent les valeurs de fluorescence à 532 nm et donc la densité de surface en glycocluster. De plus, pour le glycocluster G2, les valeurs d'IC_{50} et de FI_{532} obtenues avec 10 µM et 25 µM d'ADN spotté sur la surface du microarray sont respectivement de 21406 et 19516 µM pour l'IC_{50} et de 27625 et 25365 u.a. pour FI_{532}. Les deux valeurs d'IC_{50} sont très similaires ainsi que les deux valeurs FI_{532} montrant qu'à même densité de surface en glycoclusters, l'IC_{50} ne varie pas. En revanche, pour le glycocluster G1, la valeur d'IC_{50} obtenue avec 25 µM d'ADN spotté diminue par rapport à celle obtenue avec 10 µM d'ADN spotté alors que les valeurs de FI_{532} sont semblables. Ceci pourrait être dû au fait que l'immobilisation de G1 à 10 µM d'ADN spotté possède une plus grande variabilité qu'à 25 µM d'ADN pouvant engendrer un biais dans la mesure de l'IC_{50} et que les valeurs d'IC_{50} sont obtenues en utilisant une échelle logarithmique. En effet, les valeurs d'IC_{50} sont obtenues à partir d'un modèle dans lequel, une échelle logarithmique est utilisée pour l'axe des abscisses. La conséquence est qu'une faible translation selon l'axe des x de la courbe lors du fit engendre une forte variation de la valeur d'IC_{50}. C'est pourquoi, la mesure d'IC_{50} est une mesure semi-quantitative. Enfin, pour les deux glycoclusters G1 et G2, les valeurs d'IC_{50} et de FI_{532} augmentent proportionnellement d'un facteur 2 entre 0.5 et 10 µM d'ADN spotté sur le microarray. Par exemple, pour G1, les valeurs de FI_{532} obtenues pour 0.5, 1 et 10 µM d'ADN spotté sont respectivement de 5091, 9442 et 21126 u.a. et celles d'IC_{50} sont respectivement de 428, 848, et 1552 µM. Ces résultats illustrent bien que les mesures d'IC_{50} sont fonction linéaire de la densité de surface en glycocluster.

Ceci peut s'expliquer par le fait que, les valeurs d'IC_{50} obtenues sont le produit d'une compétition entre les galactoses portés par les glycoclusters et le lactose pour lier le même site d'interaction sur PA-IL. Cheng et Pursoff ont fait la démonstration que dans le cas d'une réaction enzymatique impliquant un inhibiteur capable de rentrer en compétition avec le substrat, la valeur d'IC_{50} dépend de la concentration en substrat (Cheng and Prusoff, 1973). Plus tard, Kitov et Bundle ont étudié le cas où une compétition intervenait entre un ligand (L) et un inhibiteur (I) pour lier un récepteur (R). Il a été montré que la valeur d'IC_{50} dépendait de la concentration en ligand (Kitov and Bundle, 2003) :

$$IC_{50} = \frac{1 + K_L[L]}{K_I}$$

Où K_L et K_I sont les constantes d'interaction à l'équilibre du complexe RL et RI respectivement, et [L] la concentration en ligand. L'IC_{50} est la concentration en inhibiteur nécessaire pour déplacer 50 % de l'interaction du complexe RL.

Par conséquent, cette relation met en évidence le fait que les valeurs d'IC_{50} dépendent de la densité de surface en glycocluster (équivalent à [L]). En conséquence, les valeurs d'IC_{50} obtenues ne sont comparables que si les densités de surface en molécules sont similaires. Dans notre cas, la densité de surface en glycocluster est toujours contrôlée grâce à la fluorescence émise à 532 nm par le Cy3 greffé au glycocluster (cf. 2.3.4). Une correction de la valeur d'IC_{50} grâce à la valeur de la FI_{532} peut être envisagée si les mesures sont effectuées dans des conditions d'acquisition du signal de fluorescence similaires comme des microarrays présentant des profondeurs de puits identiques ou encore une même gamme de concentration de compétiteur.

3.4.2. K_d = f(densité de surface)

L'influence de la densité de surface en glycocluster a aussi été investiguée pour la mesure de la constante de dissociation, K_d, des complexes des glycoclusters G1 et G2 avec PA-IL. Pour chaque glycocluster et chaque densité de surface, une isotherme a été obtenue en augmentant la concentration de lectine (Figure 3-10). Puis les valeurs de K_d ont été obtenues grâce à la régression linéaire suivante : $\frac{[Lectine]}{FI} = \frac{1}{FImax} * [lectine] + \frac{Kd}{FImax}$ (Kuno et al., 2005; Park and Shin, 2007) (cf. 2.4.4.2 et Annexe D).

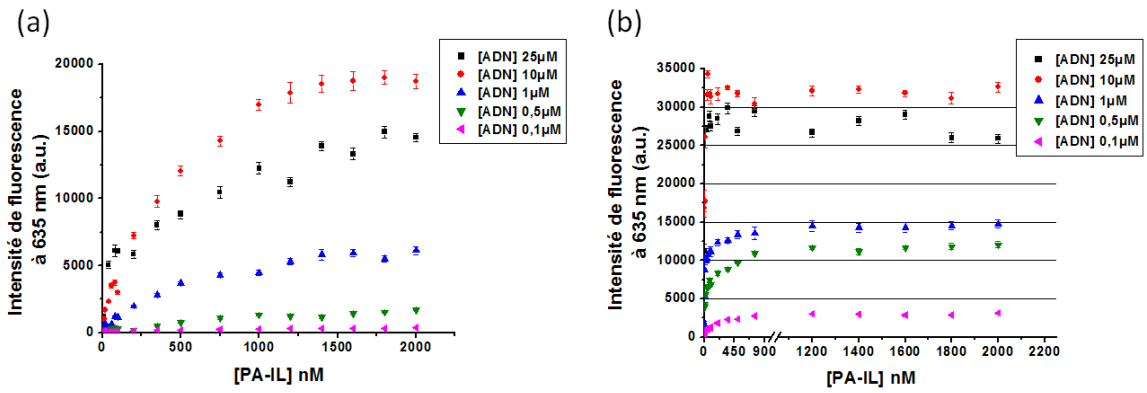


Figure 3-10 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par Alexa647_PA-IL en fonction de la concentration en [PA-IL] pour le glycocluster G1 (a) et le glycocluster G2 (b).

A l'exception du glycocluster G2 hybridé sur l'ADN spotté à 10 et 25 µM, toutes les densités de surface en glycoclusters ont permis d'obtenir une augmentation progressive de la fluorescence émise par la lectine interagissant avec le glycocluster immobilisé sur le microarray. Puis, la FI_{635} a atteint un plateau traduisant que la quantité maximum de lectine pouvant interagir avec les glycoclusters avait été atteinte. Pour toutes les densités de surface en glycoclusters G1 et G2, une valeur de K_d a pu être calculée.

La figure 3-11 met en relation les densités de surface en glycoclusters avec les valeurs de K_d obtenues pour chacune d'elles. Pour cela, il a été tracé le signal émis à 532 nm par les glycoclusters (en vert) et les valeurs de K_d obtenues pour chaque densité de surface en glycoclusters (en rouge) en fonction de la concentration d'ADN spotté sur le microarray et cela pour le glycocluster G1 et G2.

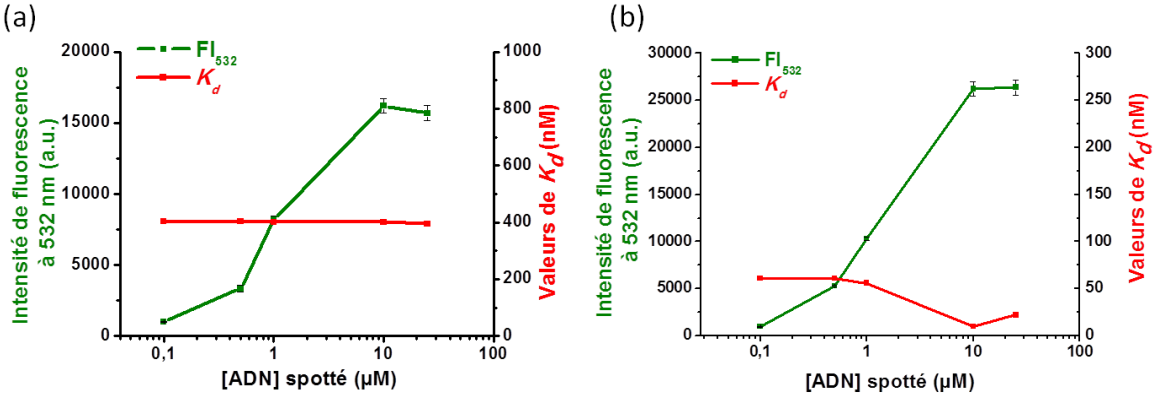


Figure 3-11 : Moyenne des intensités de fluorescence émises par le Cy3_glycocluster (en vert) et valeurs de K_d obtenues (en rouge) en fonction de la concentration en ADN spotté pour le glycocluster G1 (a) et le glycocluster G2 (b).

Pour le glycocluster G1, il est observé que bien que la densité relative de surface en glycoclusters augmentent (FI_{532}), les valeurs de K_d restent les mêmes. La valeur moyenne des

K_d obtenue pour toutes les densités de surface est de 398 nM avec un coefficient de variation de 1.5 %.

Pour le glycocluster G2, les valeurs de K_d restent constantes à 57 nM (coefficient de variation de 8 %) quand les concentrations en ADN spotté sont inférieures à 1.0 µM. Cependant, à plus haute densité de surface en glycoclusters (supérieure à 10 µM d'ADN spotté), les valeurs de K_d diminuent autour de 10-22 nM. Certains auteurs ont rapporté qu'augmenter la densité de surface en sucre simple conduisait à diminuer la valeur de la constante de dissociation due à la faible distance entre les sucres permettant un effet cluster de surface (Godula and Bertozzi, 2012; Liang et al., 2011, 2008, 2007; Smith et al., 2003) (cf. 3.1). Dans notre cas, la distance entre deux glycoclusters ne permet pas l'interaction de plusieurs glycoclusters avec une lectine ce qui exclut un effet cluster de surface. Néanmoins le glycocluster G2 possède une plus forte affinité pour PA-IL que le glycocluster G1. Aux plus fortes densités de surface en G2, (supérieure à 10 µM d'ADN spotté), il a été montré que le plateau de l'isotherme était atteint, de façon abrupte, dès les faibles concentrations en lectines ne permettant pas une augmentation progressive de l'interaction de la lectine avec le glycocluster (Figure 3-10b). Les régressions linéaires associées à ces isothermes présentent des points très proches de l'origine dès les faibles concentrations en lectine conduisant à un fit aberrant pouvant couper l'ordonnée à l'origine dans les négatifs.

Les valeurs de K_d en résultant sont donc aberrantes. Il apparait donc que tracer des isothermes avec une augmentation progressive de la FI_{635} est essentiel pour obtenir une valeur précise du K_d. A priori, ce problème pourrait être résolu en utilisant des concentrations plus faible de PA-IL. Cependant, le modèle utilisé pour tracer les isothermes et obtenir les valeurs de K_d nécessite d'être en excès de lectine par rapport au glycocluster (Kuno et al., 2005). Cette condition ne serait pas respectée si la concentration en lectine est trop faible. C'est pourquoi, le seul moyen d'obtenir une isotherme progressive et donc une mesure fiable de K_d pour le glycocluster G2 est de diminuer la densité de surface en glycocluster. La constante de dissociation reflète, à l'équilibre, la concentration de lectine nécessaire pour avoir la moitié des glycoclusters immobilisés interagissant avec la lectine PA-IL. C'est une constante thermodynamique qui ne devrait pas varier avec les conditions expérimentales. En effet, la méthode utilisée pour déterminer les valeurs de K_d sur le microarray a bien montré que celles-ci ne dépendent pas de la densité de surface en glycocluster du moment où une isotherme progressive est obtenue. Cela a été le cas pour le glycocluster G1 mais pas pour G2. C'est pourquoi, pour les glycoclusters ayant une forte affinité pour la lectine testée, il est important

de s'assurer que l'isotherme à une bonne allure et respecte les conditions initiales du modèle utilisé.

3.5. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il est possible de faire varier la densité de surface en glycocluster sur le microarray en modulant la quantité d'ADN simple brin immobilisée de façon covalente sur celui-ci. De plus, il a été démontré par une étude AFM, qu'à la plus forte densité de surface en glycoclusters, l'immobilisation de ceux-ci est homogène et que la distance entre deux glycoclusters est suffisamment grande pour empêcher un effet cluster de surface. Ainsi, le glycocluster-microarray développé au laboratoire permet bien d'évaluer l'effet cluster dû à la multivalence du glycocluster en lui-même.

L'importance de maîtriser la densité de surface en glycocluster pour l'évaluation de leur force d'interaction avec la lectine a aussi été soulignée, tant pour la mesure de la valeur de l'IC_{50} que pour celle de la constante de dissociation, K_d. Cette étude a clairement montré que la mesure des valeurs d'IC_{50} est dépendante de la densité de surface relative en glycocluster. Ainsi, il a été observé que les valeurs d'IC_{50} augmentent proportionnellement avec la densité de surface relative en glycocluster. C'est pourquoi, seules des IC_{50} obtenues avec des densités de surface en glycoclusters similaires peuvent être comparées directement ou après correction dans la mesure où le signal de fluorescence à 532 nm est comparable (conditions d'acquisition similaires, profondeur de puits identiques, …).

Pour ce qui est de la mesure de la constante de dissociation sur le microarray, il apparait que la densité de surface relative en glycocluster n'influence pas la valeur de K_d si les conditions expérimentales permettent le tracé d'une isotherme progressive. Dans le cas d'un glycocluster ayant une forte affinité pour la lectine étudiée, il a été essentiel de pouvoir diminuer la densité de surface en glycocluster afin d'obtenir une isotherme sur laquelle le plateau à été atteint progressivement permettant d'obtenir une régression linéaire correcte et ainsi une valeur précise du K_d. De plus, l'étude a montré que l'évaluation du K_d pour un même glycocluster sur le microarray a un coefficient de variation inférieur à 10 %. L'évaluation des K_d des glycoclusters G1 et G2 a également été faite par la technique ITC. Ils présentent respectivement, un K_d de 11 µM et 194 nM donnant un même classement d'affinité pour la lectine PA-IL que les mesures d'IC_{50} et de K_d effectuées sur microarray (Ligeour et al., 2015b). Il apparait, néanmoins que les valeurs de K_d obtenues sur microarray sont inférieures à celles obtenues par ITC. Il est important de rappeler que les mesures de K_d ne sont pas

effectuées dans les mêmes conditions avec les deux techniques, l'ITC permettant de faire une mesure en solution alors qu'avec le microarray les glycoclusters sont immobilisés. Ils perdent ainsi leur liberté de se déplacer dans les trois dimensions de l'espace et donc l'entropie de translation, il s'agit donc d'un K_d de surface. Enfin, il peut être souligné que suivant la méthodologie employée pour mesurer un K_d par ITC, celui-ci peut fluctuer. Il peut être cité l'exemple d'un glycodendrimère peptidique aromatique ciblant PA-IL dont l'évalution du K_d a diminué d'un facteur 40 suivant, notamment, le moyen de titration (directe : injection de ligand ou inverse : injection de lectine) (Kadam et al., 2011; Visini et al., 2015).

Chapitre 4

Criblage d’une bibliothèque d’oligo- et polysaccharides sur le glycocluster-microarray

4. Criblage d'une bibliothèque d'oligo- et polysaccharides sur le glycocluster-microarray

Après s'être intéressé, dans le chapitre précédent, aux paramètres importants qui régissent l'analyse des interactions glycocluster/lectine sur le glycocluster-microarray, nous allons présenter le criblage d'une biblothèque d'oligosaccharides et de polysaccharides provenant de l'OligoTech® d'Elicityl sur cet outil.

Le but de ce criblage est d'identifier les saccharides présentant la meilleure affinité pour les lectines de PA et de comprendre la relation structure/affinité de ces interactions. De ce criblage sera aussi sélectionné les saccharides (sucres) destinés à être assemblés sur plateforme pour la synthèse de glycoclusters par nos collègues de l'IBMM. L'étude de l'interaction de ces glycoclusters vis-à-vis de PA-IL ou PA-IIL sur glycocluster-microarray, est présentée dans le chapitre 5.

Ce chapitre décrira, tout d'abord, la mise en place d'un test de criblage haut débit de ces sucres sur le glycocluster-microarray, puis les résultats obtenus avec deux lectines de *Pseudomonas aeruginosa*, PA-IL et PA-IIL.

4.1. Mise en place du test de criblage

Le choix des 156 sucres, a été basé sur des ligands putatifs ou avérés des lectines de PA décrits dans la littérature, sur des oligosaccharides présents à la surface des cellules pulmonaires et enfin sur des polysaccharides issus de la biomasse dont les motifs de répétition pouvaient présenter une affinité vis-à-vis des lectines de PA.

4.1.1. Description

Le test de criblage de la bibliothèque de sucres sur le glycocluster-microarray repose sur un test de compétition. Pour cela, trois glycoclusters de référence sont immobilisés sur le microarray et sont mis en compétition avec un sucre pour lier la lectine testée (cf. 2.4.2.1). Les trois glycoclusters de référence utilisés pour le crible ont été choisis en fonction de leur

affinité vis-à-vis de la lectine testée, ils présentent, respectivement, une faible (G_{faible}), une moyenne (G_{moyen}) et une forte (G_{fort}) affinité pour la lectine. Grâce à la micro-structuration des lames en micropuits, il est possible dans chaque puits d'incuber une solution contenant la lectine et un sucre avec ces trois glycoclusters de référence immobilisés.

Le signal de fluorescence mesuré lors de ce test est celui émis par l'Alexa647_lectine interagissant avec les glycoclusters de référence immobilisés sur le microarray. Ainsi, si le sucre testé est capable de rentrer en compétition avec les glycoclusters de référence immobilisés sur le microarray, la lectine interagissant avec le sucre sera éliminée pendant les lavages et le signal de fluorescence diminuera. Donc, plus le signal du complexe Alexa647_lectine/glycocluster est faible, plus l'interaction du sucre avec la lectine est forte. Le principe de ce test est présenté dans la figure 4-1 avec quatre sucres provenant de l'OligoTech® présentant soit pas d'affinité pour la lectine, soit une affinité faible, moyenne ou forte pour celle-ci.

Par exemple, un sucre présentant une affinité moyenne pour la lectine devrait être capable de complètement déplacer l'interaction de la lectine avec le glycocluster G_{faible}, partiellement avec le glycocluster G_{moyen} et peu ou pas avec le glycocluster G_{fort}. En d'autres mots, ce sucre qui est capable de rentrer en compétition avec le glycocluster de réf. G_{moyen} présentera plus d'affinité pour la lectine qu'un sucre capable de rentrer en compétition seulement avec le glycocluster de réf. G_{faible} et moins qu'un capable de rentrer en compétition avec le glycocluster de réf. G_{fort}.

Pour réaliser le criblage des 156 sucres, il est donc nécessaire d'avoir des glycoclusters de référence. Ceux-ci sont bien identifiés pour PA-IL et PA-IIL, il s'agit respectivement, de trois galactoclusters et de trois fucoclusters (cf. 2.4.2.1). Pour ce qui est des lectines du flagelle et du *pili* de *Pseudomonas aeruginosa* (FliC, FliD, PilA, PilY1 et CupB6), les glycoclusters de référence ont été synthétisés sur la base de ligands putatifs présentés dans la littérature (cf. 1.2). Cependant, nous n'avons pas observé d'interactions significatives entre ces glycoclusters de référence et ces 5 lectines (cf. 5.3).

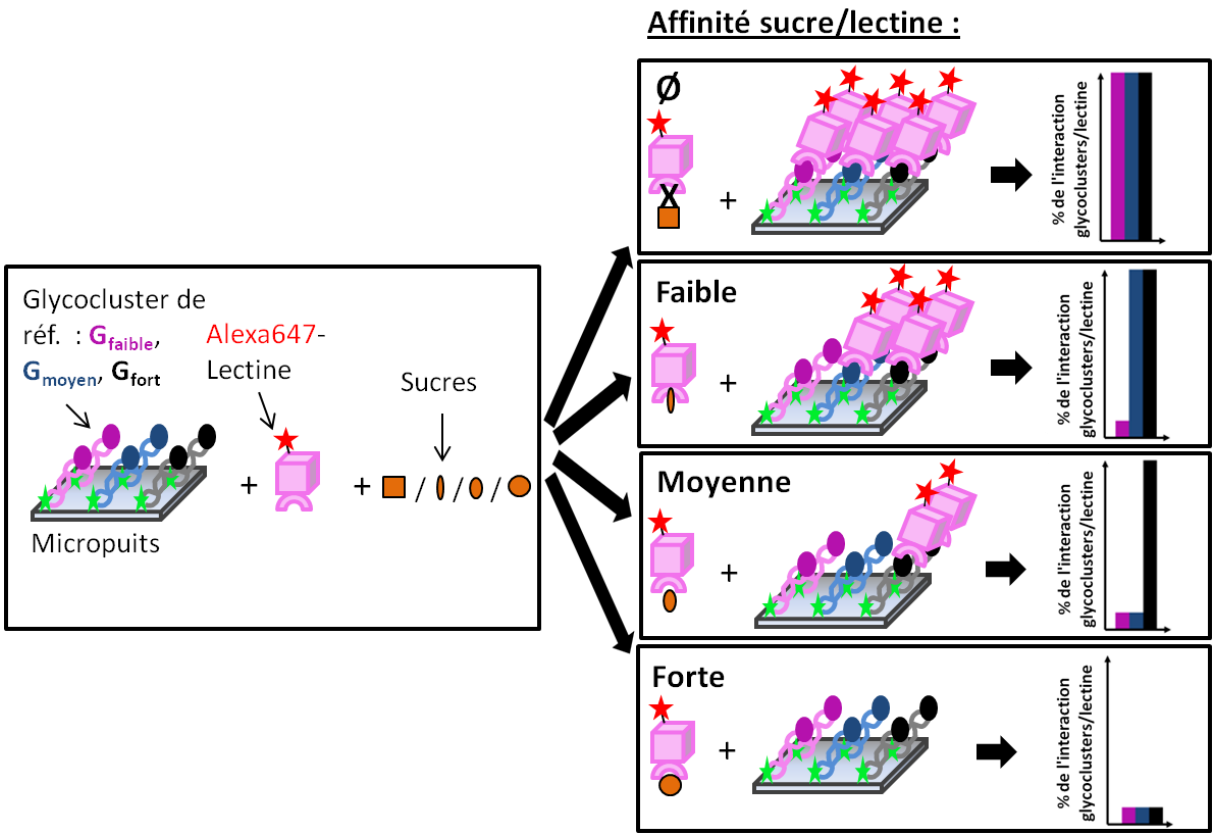


Figure 4-1 : Principe du criblage de la bibliothèque de sucres sur le glycocluster-microarray avec l'exemple de quatre sucres présentant soit pas d'affinité pour la lectine, soit une affinité faible, moyenne ou forte pour celle-ci.

Le criblage est effectué avec quatre concentrations croissantes en sucres (concentrations n°1 à 4). Ceci permet d'obtenir une « courbe » de compétition qualitative puisqu'elle est réalisée avec seulement quatre points.

La mise en place de ce test nécessite la préparation de nombreuses solutions. En effet, ce criblage vis-à-vis d'une lectine nécessite la préparation de plus de 1200 solutions. Pour ce faire, ces solutions ont été préparées à l'aide d'un robot de pipetage (Freedom EVO100, TECAN) permettant de réaliser ces solutions en peu de temps, avec de faibles volumes et une forte précision de pipetage (jusqu'à 1 µL avec un coefficient de variation inférieur à 6 %). Le développement des protocoles de pipetage, par le robot, des différentes solutions ainsi que des programmes permettant la préparation des solutions ont été réalisés pendant cette thèse. L'utilisation du microarray sur lequel les spots sont réalisés avec le robot de spotting (SCIENION sciFLEXARRAYER s3) complété par l'utilisation de ce robot de pipetage a permis un criblage haut débit des 156 saccharides.

4.1.2. Choix des concentrations de criblage

L'affinité des glycoclusters de référence choisis pour réaliser le criblage vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL a été évaluée par une mesure de la valeur d'IC_{50} lors de la thèse du Dr. Alice Goudot (Gerland et al., 2014; Goudot et al., 2013). Ces valeurs d'IC_{50} ont été obtenues en mettant en compétition les glycoclusters de référence ciblant PA-IL et PA-IIL avec respectivement du lactose et du fucose (Tableau 4-1).

Glycocluster de réf.	IC_{50} crible avec PA-IL (µM)	IC_{50} crible avec PA-IIL (µM)
G_{faible}	50	10
G_{moyen}	750	20
G_{fort}	3 000	30

Tableau 4-1 : Valeurs d'IC_{50} des différents glycoclusters de référence utilisés pour le criblage des 156 sucres vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL.

Le choix des quatre concentrations testées pour chaque sucre a été fait en fonction de ces valeurs d'IC_{50}. Les concentrations choisies pour effectuer le criblage vis-à-vis de PA-IL sont de 1, 10, 100 et 1000 µM et celles vis-à-vis de PA-IIL sont de 0.1, 1, 5 et 15 µM. Lorsque la masse molaire des sucres n'étaient pas connue comme pour certains polysaccharides, les concentrations choisies furent 0.005, 0.05, 0.5 et 5 mg/mL pour le criblage avec PA-IL et 0.5, 5, 25 et 75 µg/mL pour PA-IIL représentant une masse molaire plus de 20 fois supérieure à un monosaccharide (cf. 2.4.2.2).

La figure 4-2 présente l'exemple de deux sucres présentant moins et plus d'affinité pour PA-IIL que le fucose. Dans le premier cas (sucre < fucose), les courbes d'inhibition de l'interaction fucoclusters de référence/lectine par le sucre (courbes en pointillé de la figure 4-2) seront décalées vers la droite par rapport à celles du fucose (courbes en trait plein de la figure 4-2). En effet, il faudra plus de sucre que de fucose pour empêcher l'interaction fucoclusters/PA-IIL (Figure 4-2a). A l'inverse dans le deuxième cas (sucre > fucose), les courbes d'inhibition de l'interaction glycoclusters de référence/lectine seront décalées vers la gauche par rapport à celles du fucose (Figure 4-2b). Comme expliqué ci-dessus, il est testé quatre concentrations croissantes de chaque sucre pour effectuer le criblage vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL, les points (triangles) présents sur la figure 4-2a et figure 4-2b représentent ces concentrations. Une courbe d'inhibition ne peut être construite avec 4 points, la figure 4-2c et figure 4-2d traduisent donc les résultats typiquement obtenus pour les deux sucres ayant respectivement une plus faible et une plus forte affinité pour PA-IIL que le fucose.

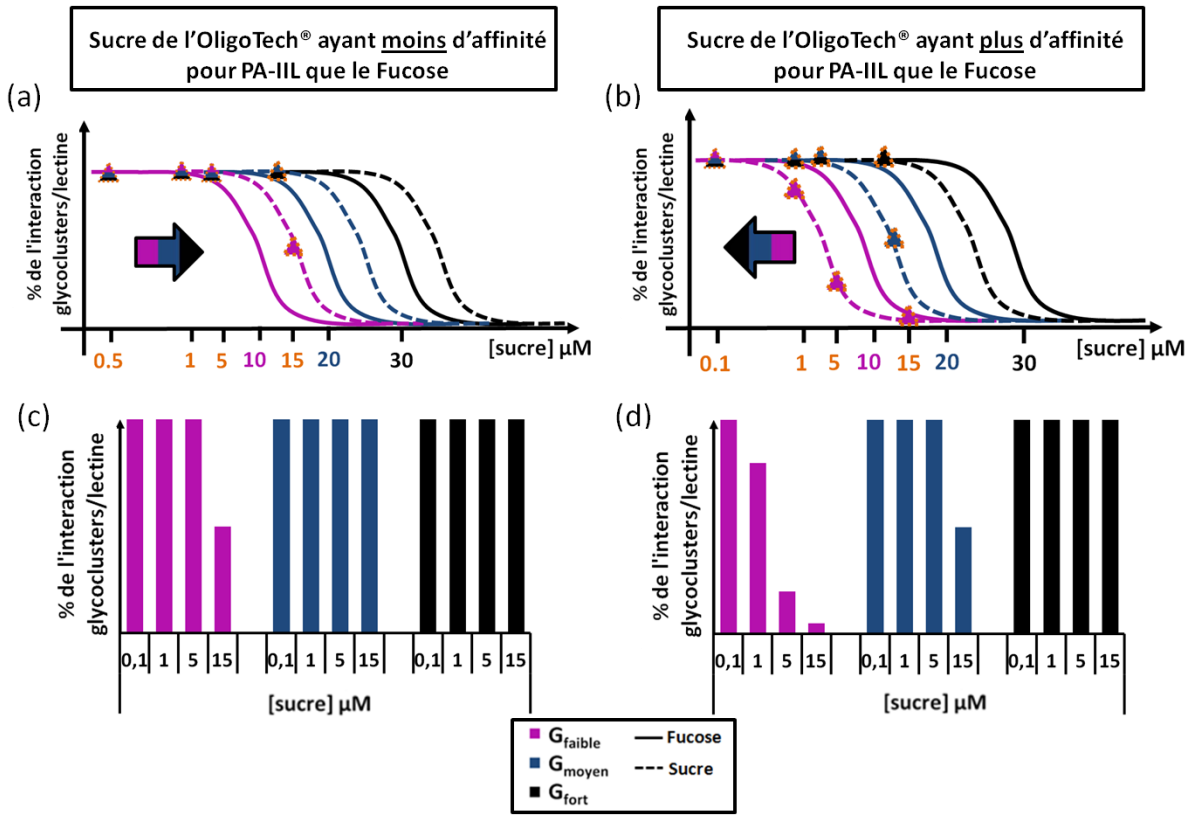


Figure 4-2 : Représentation schématique des courbes IC_{50} obtenues dans le cas où le sucre présente moins (a) ou plus (b) d'affinité que le fucose pour PA-IIL ainsi que les résultats typiquement obtenus dans ces deux cas en fonction des concentrations choisies pour effectuer le criblage (c et d).

Enfin, bien que ce test de criblage soit plus gourmand en matériel (quelques dizaines de picomoles) que des méthodes plus conventionnelles utilisant les microarrays (ex : « Consortium for Functional Glycomics » où les sucres sont immobilisés sur un même microarray), notre test présente plusieurs avantages :

- Les sucres de la bibliothèque n'étant pas immobilisés sur le microarray, il n'est donc pas nécessaire de les modifier.
- L'interaction entre sucre/lectine se fait en solution évitant le phénomène d'effet cluster de surface qui peut survenir lors de l'immobilisation (hors DDI) (cf. 3.1).

4.1.3. Choix du classement des sucres

Puisque le criblage correspond à une inhibition réalisée avec quatre concentrations différentes en sucre, le résultat est qualitatif mais permet de classer les sucres en cinq groupes : A, B, C, D et ceux ne montrant aucune interaction. La note A correspondant aux plus affins et D aux moins affins pour la lectine testée. Puisque ce criblage nécessite l'utilisation de plusieurs microarrays, les signaux de fluorescence ont été normalisés. Le 100 % d'interaction glycocluster/lectine correspond au signal de fluorescence mesuré entre un glycocluster de

référence et la lectine avec soit 1 µM de lactose (PA-IL) soit 0.1 µM de fucose (PA-IIL). Dans ces conditions, il n'est pas observé d'inhibition de l'interaction glycoclusters de référence/lectine. En effet, l'IC_{50} des glycoclusters de référence est au moins 50 fois supérieur. Le pourcentage de l'interaction glycocluster/lectine correspond au signal de fluorescence normalisé pour un glycocluster de référence en compétition avec une concentration donnée de sucre. Le complémentaire de ce pourcentage d'interaction glycocluster/lectine reflète le potentiel d'inhibition de l'interaction glycocluster/lectine qu'a le sucre testé.

4.1.3.1. Classement pour le criblage réalisé avec PA-IL

La figure 4-3 donne un exemple du potentiel d'inhibition de l'interaction de chaque galactocluster de référence avec PA-IL par deux sucres provenant de l'OligoTech®. On s'aperçoit que pour chaque sucre le potentiel d'inhibition de l'interaction galactocluster/PA-IL est plus fort avec le galactocluster de réf. G_{faible} $(Pe\text{-}MTzEG_3\text{-}Gal_2)_2^{1+}$) qu'avec le G_{moyen} $(DMCH\text{-}MTzEG_3\text{-}Gal)_4$) puis qu'avec le G_{fort} $(Man(proTzAcNPh\text{-}Gal)_{4+}$, aussi appelé G2 dans le chapitre 3. En effet, si l'on prend l'exemple du sucre correspondant à un antigène du groupe sanguin A (Id. 15), son potentiel d'inhibition de l'interaction galactocluster/PA-IL à 1000 µM est de 82 % pour le galactocluster de réf. G_{faible}, de 75 % pour le G_{moyen} et de 10 % pour le G_{fort}. Cependant, il apparait que le profil d'inhibition par les sucres de l'interaction galactocluster/PA-IL est assez semblable entre le galactocluster de réf. G_{faible} et G_{moyen} et que les différences sont plus marquées avec le G_{fort}. C'est pourquoi, le choix du classement des sucres provenant de l'OligoTech® vis-à-vis de leur affinité pour PA-IL a été fait en considérant deux profils d'inhibition de l'interaction galactocluster/PA-IL par les sucres, celui du galactocluster de réf. G_{moyen} (semblable au G_{faible}) et celui du G_{fort}.

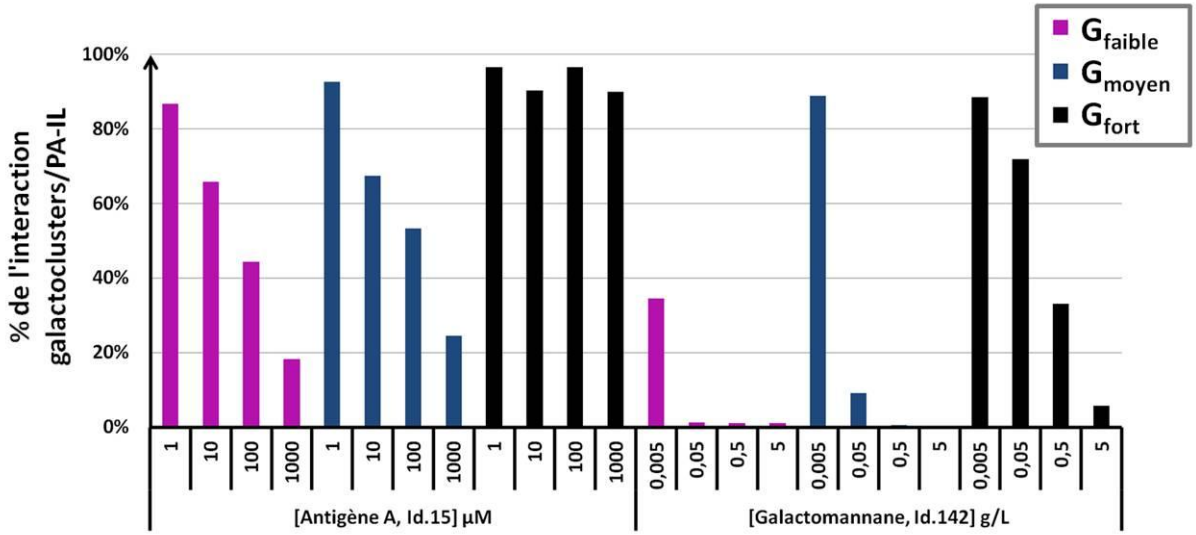


Figure 4-3 : Potentiel d'inhibition de l'interaction des trois galactoclusters de référence avec PA-IL par deux sucres provenant de l'OligoTech® : l'antigène A (Id.15) et le galactomannane (Id.142).

Les sucres ayant obtenu la note de A sont ceux qui permettent au minimum une inhibition de l'interaction galactocluster/PA-IL de 90 % à 10 µM pour le galactocluster de réf. G_{moyen} et de 70 % à 100 µM pour le G_{fort}. Ensuite, la note de B a été attribuée aux sucres qui ont un potentiel d'inhibition de l'interaction galactocluster/PA-IL compris entre 45 % à 100 µM et 90 % à 10 µM pour le G_{moyen} et entre 40 % à 1000 µM et 70 % à 100 µM pour le G_{fort}. Ce potentiel d'inhibition est compris entre 80 % à 1000 µM et 45 % à 100 µM pour le G_{moyen} et entre 10 % et 40 % à 1000 µM pour le G_{fort} pour les sucres ayant obtenu la note de C. Enfin, pour la note de D, le potentiel d'inhibition est compris entre 25 % et 80 % à 1000 µM pour le G_{moyen} et de maximum 10 % à 1000 µM pour le G_{fort} (Figure 4-4).

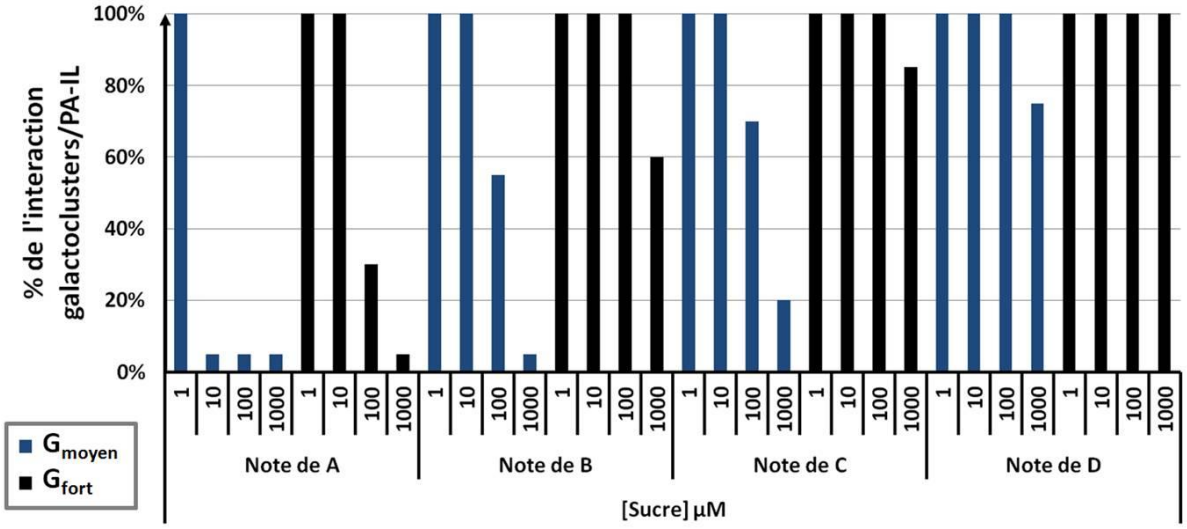


Figure 4-4 : Maximum du pourcentage de l'interaction galactocluster/PA-IL observable pour chacun des groupes A, B, C et D.

4.1.3.2. Classement pour le criblage réalisé avec PA-IIL

La figure 4-5 donne un exemple du potentiel d'inhibition de l'interaction de chaque fucoclusters de référence avec PA-IIL par deux sucres provenant de l'OligoTech®. On s'aperçoit que pour les trois fucoclusters de référence les profils d'inhibition de l'interaction avec PA-IIL par les sucres sont très semblables. Par exemple, le potentiel d'inhibition de l'interaction fucocluster/PA-IIL par le xyloglucane à 1 µM est de 90 % pour le G_{faible} ((Pe-MTzEG$_3$-Fuc$_2$)$_2$) de 81 % pour le G_{moyen} (Man(proTzEG$_3$-Fuc)$_8$) et de 88 % pour le G_{fort} (Xylo(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_3$). Cette observation peut être expliquée par le fait que les IC_{50} des trois fucoclusters de référence sont proches les uns des autres et que donc leurs différences d'affinité avec PA-IIL ne sont pas très marquées comparé au cas de PA-IL avec les trois galactoclusters.

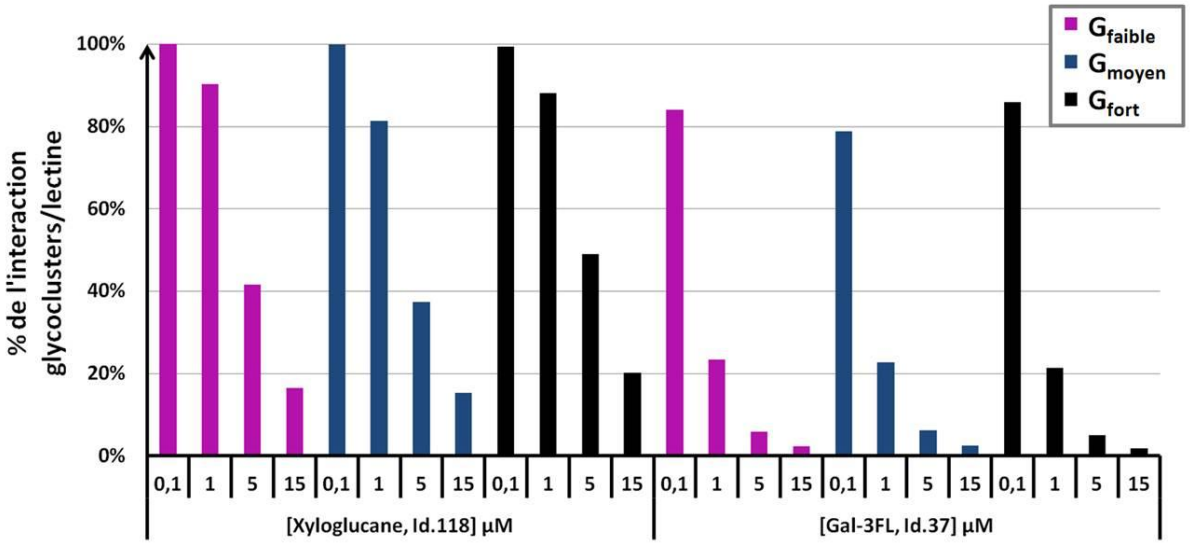


Figure 4-5 : Potentiel d'inhibition de l'interaction des trois fucoclusters de référence avec PA-IIL par deux sucres provenant de l'OligoTech® : le xyloglucane (Id. 118) et le galactosyl-3Fucosylactose (Gal-3FL, Id. 37).

Le choix du classement des sucres vis-à-vis de leur affinité pour PA-IIL n'a donc pu être fait qu'en considérant qu'un seul profil d'inhibition de l'interaction fucocluster/PA-IIL. Néanmoins, l'attribution de la note a été faite en considérant les résultats de chacun des fucoclusters de référence. Ainsi, la figure 4-6 présente pour chacun des groupes A, B, C ou D, le maximum du pourcentage de l'interaction fucocluster/PA-IIL observable en présence de concentrations croissantes des sucres.

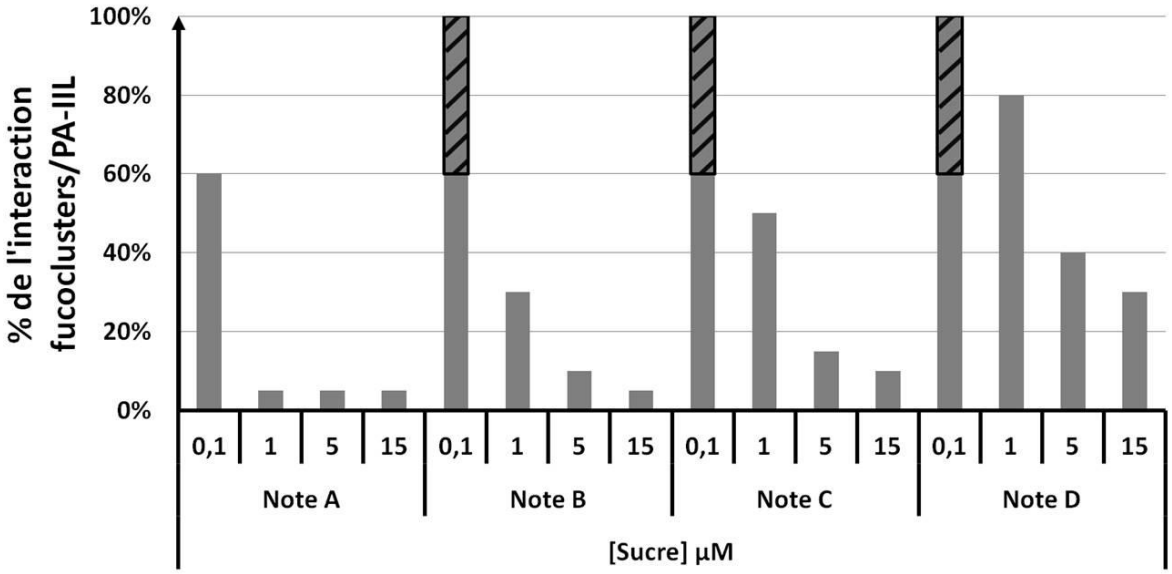


Figure 4-6 : Maximum du pourcentage de l'interaction fucoclusters/PA-IIL observable pour chacun des groupes A, B, C et D (En rayure, % d'interaction similaire entre les notes B, C et D).

La note de A a donc été attribuée aux sucres qui à 1, 5 et 15 µM sont capables d'inhiber complètement l'interaction des trois fucoclusters de référence avec PA-IIL et partiellement à 0.1 µM (potentiel d'inhibition > 40 %). Pour les sucres ayant obtenu la note de B, C ou D, les niveaux d'interaction fucocluster/PA-IIL avec 0.1 µM de sucre peuvent être similaires (zone en rayure sur le figure 4-6) entre les différents groupes, ce qui n'est pas le cas à 1, 5 et 15 µM. Il peut être supposé qu'à 0.1 µM de sucre et pour un sucre ayant une affinité moyenne ou faible pour PA-IIL, cette concentration est trop faible pour permettre une mesure précise. L'attribution de la note B, C ou D a donc été faite en considérant les résultats obtenus à 1, 5 et 15 µM de sucre. Par exemple, à 1 µM de sucre utilisé, les sucres permettant une inhibition de l'interaction fucocluster/PA-IIL comprise entre 20 et 50 % ont la note de D, entre 50 et 70 % la note de C et entre 70 % et 90 % la note de A.

Par la suite, les résultats du criblage sur PA-IL et PA-IIL sont présentés. Cependant, afin de faciliter la clarté du propos, tous les histogrammes de compétition ne sont pas présentés. Ceux des sucres ayant démontré une affinité pour PA-IL ou PA-IIL se trouvent en Annexe E.

4.2. Criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IL

PA-IL est une lectine soluble tétravalente de *Pseudomonas aeruginosa* qui interagit spécifiquement avec le galactose en présence d'un atome de Ca^{2+} (cf. 1.2.3.1).

4.2.1. Vue d'ensemble des résultats

Le criblage des 156 sucres vis-à-vis de PA-IL a révélé que 44 sucres interagissaient avec PA-IL. Parmi ces sucres, 8 ont obtenu la note de A, 11 celle de B, 11 celle de C, 12 celle de D et enfin 2 sucres ont été classés comme faux-positifs.

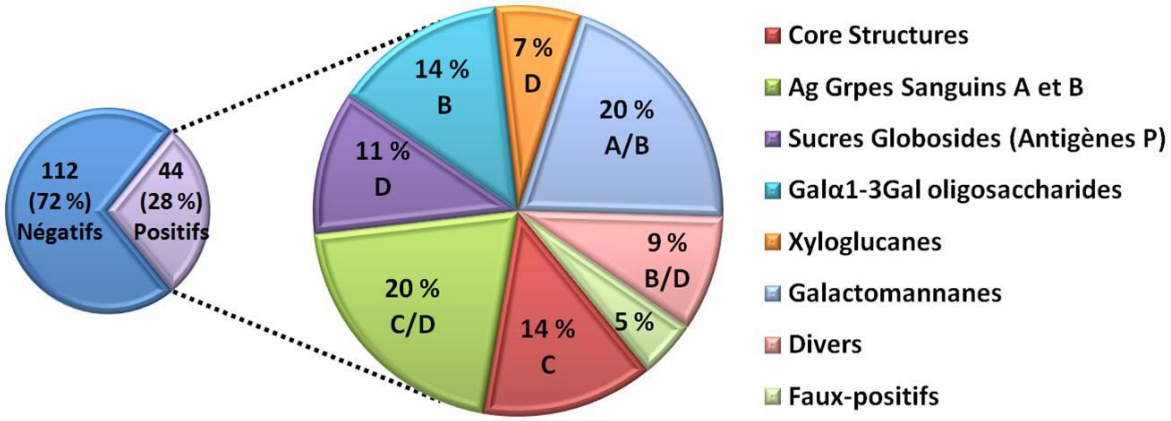


Figure 4-7 : Diagramme des différentes familles de sucres reconnues par PA-IL avec leur classement associé.

Le diagramme ci-dessus présente les proportions des différentes familles de sucres que le criblage a révélé pour interagir avec PA-IL avec la note qu'elles ont majoritairement obtenues (Figure 4-7). Près de 30 % de ces sucres sont des oligosaccharides et polysaccharides extraits de la biomasse et 70 % sont des oligosaccharides produits par fermentation bactérienne.

Il est observé que deux des sucres sont des faux-positifs c'est-à-dire des sucres que le criblage a montré comme pouvant interagir avec PA-IL alors que ce n'est pas le cas. Il s'agit de deux mannanes constitués d'un enchainement d'unités β-D-Mannose reliées entre elles par une liaison 1-4. Pour le premier mannane (Id.149, Tableau 2-2), il n'a été observé aucune interaction galactocluster/PA-IL. La raison d'un tel résultat est que ce mannane a du être solubilisé dans une solution de PBS 1X contenant 5 % de NaOH entrainant, aux concentrations testées, un pH > 9-10 auquel PA-IL n'est plus active. D'autre part, pour le deuxième mannane (Id.150), il est observé une inhibition partielle de l'interaction galactocluster/PA-IL. Ce mannane n'étant composé que d'un enchainement de D-mannose, il ne peut pas interagir avec PA-IL. Il est donc supposé que, puisque ces polysaccharides sont issus de la biomasse, une contamination avec d'autres polysaccarides contenant du galactose est possible. En effet, le certificat d'analyse délivré par Elicityl révèle qu'il y a environ 8 % de résidus galactoses présents dans ce produit.

4.2.2. Les oligosaccharides produits par fermentation bactérienne

Environ 70 % des sucres ayant démontré une interaction avec PA-IL sont des oligosaccharides produits par fermentation bactérienne. Ils peuvent être regroupés en plusieurs familles : « Core structure » ; antigènes des groupes sanguins A et B ; oligosaccharides Galα1-3Gal et oligosaccharides type globoside (antigènes P). Le premier constat est que tous ces oligosaccharides possèdent un galactose à leur extrémité non réductrice qui est responsable de l'interaction avec PA-IL (cf. Annexe E). En effet, si l'on compare certains de ces oligosaccharides avec leur équivalent sans le galactose, ces derniers ne sont pas reconnus par PA-IL aux concentrations testées en sucre. C'est notamment le cas entre les oligosaccharides Galβ-3GlcNAcβ-4Gal (Id. 1, note D) et Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal (Id. 11) (Tableau 4-2).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Core Structure, Type I	Galβ-3GlcNAcβ-4Gal	D	1	GLY005
Ag H Gpe Sanguin O	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	/	11	GLY032-1
Core Structure, Type II	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
Ag H Gpe Sanguin O	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	/	12	GLY032-2

Tableau 4-2 : Effet du résidu à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IL.

4.2.2.1. Les différentes familles d'oligosaccharides reconnues par PA-IL

- <u>« Core Structure »</u>

La famille des « core structure » comprend deux types : I et II. Ils correspondent aux briques élémentaires ou précurseurs utilisés pour former les oligosaccharides présents dans le lait humain et mammifère, sur les mucines ou encore pour former les antigènes des groupes sanguins. La plus petite unité commune est le Galβ1-3GlcNAc pour le type I et le Galβ1-4GlcNAc pour le type II. Ils présentent en majorité une affinité assez faible, note C ou D, pour PA-IL. Il peut notamment être remarqué qu'à l'extrémité non réductrice une liaison Galβ1-4 semble être légèrement plus favorable que la liaison Galβ1-3 pour interagir avec PA-IL, tout comme un allongement de la chaine oligosaccharidique des sucres de la famille « Core structure de type II » (Tableau 4-3).

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Type I	Galβ1-3GlcNAcβ-4Gal	D	1	GLY005
	Galβ1-3GlcNAc	C^-	3	GLY009
Type II	Galβ1-4GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C^-	6	GLY021
	Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_2$Glc	C^-	7	GLY022
	Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_3$Glc	B	8	GLY023

Tableau 4-3 : Les oligosaccharides de la famille « Core Structure » reconnus par PA-IL.

- Les antigènes des groupes sanguins du système ABO

Les antigènes des groupes sanguins du système ABO sont des sucres complexes qui sont présents à la surface des globules rouges et des muqueuses de l'appareil respiratoire, urinaire, génitale et digestif (mucines). Ces sucres sont aussi retrouvés à l'état libre dans certains fluides biologiques comme la salive, le lait, et le sang. Les antigènes du groupe B sont basés sur un trisaccharide Galα1-3(Fucα1-2)Gal. Les antigènes du groupe A diffèrent par l'introduction d'un groupement *N*-Acetyl sur le galactose à l'extrémité non réductrice. Enfin, l'unité élémentaire des antigènes H (groupe O) est (Fucα1-2)Gal, ce qui correspond au groupe B sans le résidu galactose à l'extrémité non réductrice.

Les antigènes dont le criblage a montré une interaction avec PA-IL sont majoritairement ceux appartenant au groupe sanguin B. Ils ont tous obtenus une note de C ou D montrant une faible affinité pour PA-IL. Dans ce cas, il peut être noté que l'allongement de la chaine oligosaccharidique d'un degré de polymérisation (DP) de 4 à 6 n'influence pas l'interaction avec PA-IL (Tableau 4-4).

Néanmoins, il peut être remarqué que plusieurs paramètres semblent néfastes à l'interaction de PA-IL avec les oligosaccharides du groupe sanguin B comme :

- l'introduction d'un galactose à la place d'un glucose en quatrième résidu de l'oligosaccharide à partir de l'extrémité non réductrice (comparaison Id. 78 avec Id. 22)
- l'introduction d'une ramification fucose supplémentaire à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide (comparaison Id. 40 et 94 avec Id.21)

Pour les antigènes du groupe sanguin A, l'introduction d'un groupement *N*-Acétyle sur le galactose à l'extrémité non réductrice est défavorable à l'interaction avec PA-IL par rapport au groupe B (Id. 15). De plus, l'allongement de leur chaine oligosaccharidique annihile la

reconnaissance de l'oligosaccharide par PA-IL dans les conditions de ce criblage (Id.16 à 20, Tableau 2-1). Les antigènes du groupe sanguin O (antigènes H) n'ont pas été reconnus par PA-IL lors du criblage du fait de la ramification par un fucose en position 2 sur le galactose terminal (extrémité non réductrice).

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigènes A	Gal**NAc**α1-3(Fucα1-2)Gal	D	15	GLY034
Antigènes B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	C	21	GLY038-3
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	C	22	GLY039-1
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	C	23	GLY039-2
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	24	GLY040-1
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	25	GLY040-2
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3**Gal**NAcβ1-3Gal	D	78	GLY129
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	40	GLY068
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	D	94	GLY165

Tableau 4-4 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des groupes sanguins du système ABO reconnus par PA-IL.

- Les oligosaccharides type globoside (antigènes P)

Les sucres type globoside sont des oligosaccharides présents, chez l'homme et les mammifères, à la surface des globules rouges, il s'agit des antigènes du système de groupes sanguins dit P regroupant également les antigènes de Forssman. Certains de ces antigènes peuvent être exprimés dans d'autres cellules comme les cellules épithéliales de l'intestin mais aussi être libres dans le plasma.

Les sucres de cette famille que le criblage a révélé pour interagir avec PA-IL ont tous eu une affinité pour celle-ci assez faible (note C et D) à l'exception de l'antigène P^k. Ce dernier, aussi appelé Gb3, a obtenu la note de B signifiant une bonne affinité pour PA-IL (Tableau 4-5). Il semblerait donc qu'une liaison en α1-4 du galactose à l'extrémité non réductrice soit favorable à l'interaction avec PA-IL. En revanche, la présence de groupement *N*-Acétyle sur le galactose terminal ou d'une ramification fucose en position pénultième semble défavorable à l'interaction comme pour les antigènes des groupes sanguins du système ABO.

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Ag P^k (Gb3)	Galα1-4Galβ1-4Glc	B	69	GLY120
Globo-B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	D	74	GLY125
Ag Forssman	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	D	81	GLY132
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Gal	D	82	GLY133
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	C	83	GLY134

Tableau 4-5 : Les oligosaccharides de la famille des sucres type globoside (antigène P) reconnus par PA-IL.

- Les oligosaccharides à motif « Galα1-3Gal »

Les sucres appartenant à cette famille sont tous des oligosaccharides possédant le motif Galα1-3Galβ1-4Glc (iGb3) (Tableau 4-6). Certains de ces sucres possèdent ce motif ramifié avec du fucose (Id. 37) ou *N*-Acétylé sur le glucose présent à l'extrémité réductrice (Id. 42, 45-47). Ces derniers sont les antigènes Galili et Xeno. Ce type d'antigènes est fortement exprimé sur les cellules des non primates comme le cochon mais ne l'est pas chez l'homme et certains primates. Les sucres de cette famille dont le criblage a permis de détecter une interaction avec PA-IL possèdent tous le motif iGb3 à leur extrémité non réductrice. Ils ont une forte affinité pour PA-IL (note B). Il semblerait donc que tout comme une liaison α1-4, une liaison α1-3 du galactose à l'extrémité non réductrice soit plus favorable à l'interaction avec PA-IL que l'anomérie β. La longueur de la chaine oligosaccharidique ne semble pas influencer l'interaction avec PA-IL.

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Fucosylés	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	37	GLY064
IsoGb3 (iGb3)	Galα1-3Galβ1-4Glc	B	41	GLY070
Ag Galili et Xeno	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	B	42	GLY071
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_2$Galβ1-4Glc	B	45	GLY077
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_3$Galβ1-4Glc	B	46	GLY078
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_4$Galβ1-4Glc	B	47	GLY079

Tableau 4-6 : Les oligosaccharides de la famille des sucres à motif « Galα1-3Gal » reconnus par PA-IL.

- Disaccharides, Galactosyl-lactose et antigène de Lewis X

Enfin quatre autres oligosaccharides ont démontré une interaction avec PA-IL, il s'agit de deux disaccharides, du galactosyl-lactose et l'antigène de Lewis X (Tableau 4-7). Ces deux derniers ne permettent qu'une faible interaction avec PA-IL au contraire des deux disaccharides testés (Id. 85 et 86). Ceux-ci sont composés de deux galactoses reliés entre eux par soit une liaison α1-3, soit une liaison α1-4. Ce résultat confirme que ce type de liaison est favorable à l'interaction avec PA-IL et montre qu'un disaccharide est suffisant pour atteindre une bonne affinité avec PA-IL.

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Disaccharides	Galα1-3Gal	B	85	GLY153
	Galα1-4Gal	B	86	GLY154
Galactosyl-lactose	Galβ1-4Glcβ1-1βGal	D	89	GLY160
Antigène Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	D	26	GLY050

Tableau 4-7 : Les oligosaccharides type disaccharides, galactosyl-lactose et $Lewis^X$ reconnus par PA-IL.

4.2.2.2. Les paramètres influençant l'interaction avec PA-IL

Parmi les différentes familles d'oligosaccharides reconnus par PA-IL, il apparait que plusieurs paramètres influencent l'interaction avec celle-ci comme la nature de la liaison osidique, la ramification de l'oligosaccharide, sa longueur ou encore sa modification par des groupements chimiques comme le *N*-Acétyle.

- Influence de la liaison osidique

Parmi les 156 sucres provenant de l'OligoTech®, nous disposions d'oligosaccharides ne variant que par la position de la liaison osidique permettant de comparer une liaison 1-3 à une liaison 1-4 (Tableau 4-8). Les différences d'affinité entre ces deux types de liaisons sont assez proches, néanmoins, en comparant les oligosaccharides « core structure » type I et II (Id. 1 et 2), il semble qu'une liaison 1-4 soit plus favorable qu'une liaison 1-3. Ensuite, si l'on compare les trisaccharides débutant par un motif « Gal-Gal », il apparait qu'une liaison β1-3 ne permet pas de détecter d'interaction avec PA-IL dans les conditions du criblage alors qu'une liaison α1-3 (Id.41) et α1-4 (Id.69) donne une forte interaction avec PA-IL.

Le classement semble donc être :

Galα1-4 ≈ Galα1-3 >> Galβ1-4 > Galβ1-3

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Core Structure, Type I	**Galβ-3**GlcNAcβ-4Gal	D	1	GLY005
Core Structure, Type II	**Galβ-4**GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
Core Structure, Type IV	**Galβ1-3**GalNAc β1-3Gal	/	75	GLY126
IsoGb3 (iGb3)	**Galα1-3**Galβ1-4Glc	B	41	GLY070
Ag P^k (Gb3)	**Galα1-4**Galβ1-4Glc	B	69	GLY120

Tableau 4-8 : Influence de la liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IL.

De plus, il apparait qu'un oligosaccharide de type Galβ1-3Glc donne une faible interaction avec PA-IL alors que ceux de type Galβ1-3Gal ne donnent pas d'interaction mesurable avec PA-IL dans nos conditions de criblage (comparaison Id.1 et Id.75). Il semblerait donc qu'un oligosaccharide débutant par Galβ1-3Glc permet une plus forte interaction avec PA-IL qu'un débutant par Galβ1-3Gal, ce qui laisse penser que la nature du deuxième saccharide influence l'interaction avec PA-IL. Néanmoins, ce constat n'a été fait qu'avec des sucres interagissant faiblement avec PA-IL (Note D). Pour vérifier ce constat, il serait donc intéressant de tester l'affinité d'un sucre débutant par Galα1-3/4Glc, sucre non disponible actuellement dans notre bibliothèque de sucres. Enfin, la littérature décrit grâce à la co-cristallisation du mélibiose (Galα1-6Glc) avec PA-IL, la présence sur PA-IL d'un site d'interaction pour le glucose proche de celui du galactose. Cependant, l'affinité du glucose pour ce site n'a pas pu être quantifiée à travers la mesure d'un K_d par ITC indiquant que cette interaction est assez faible (Blanchard et al., 2014).

- <u>Influence de la ramification de l'oligosaccharide</u>

Le tableau 4-9 compare deux à deux, un oligosaccharide non ramifié avec son homologue ramifié avec du fucose sur le deuxième résidu en partant de l'extrémité non réductrice. Il apparait dans tous les cas, que ces derniers sont moins affins pour PA-IL en passant, de la note D à pas de détection ainsi que de la note C à D ou de B à C. Il semble donc que cette ramification avec du fucose déstabilise l'interaction de l'oligosaccharide avec PA-IL. Néanmoins, si la ramification a lieu sur le troisième résidu de l'oligosaccharide, l'affinité pour PA-IL n'est pas perturbée (Id. 37). Ces résultats laissent à penser qu'une gêne stérique peut se produire dans le cas où la ramification a lieu sur le deuxième résidu de l'oligosaccharide c'est-à-dire juste après le galactose terminal reconnu par PA-IL, gêne stérique qui n'est plus présente lorsque la ramification est positionnée plus loin du galactose terminal.

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Core Structure, Type I	Galβ-3GlcNAcβ-4Gal	D	1	GLY005
Antigène Le^A	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	/	30	GLY054
Core Structure, Type II	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
Antigène Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	D	26	GLY050
IsoGb3 (iGb3)	Galα1-3Galβ1-4Glc	B	41	GLY070
Antigène B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	C	21	GLY038-3
Galactosyl-3FL	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	37	GLY064

Tableau 4-9 : Influence de la ramification de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IL.

- Influence de la modification de l'oligosaccharide

Certains oligosaccharides de cette bibliothèque sont modifiés avec des groupements *N*-Acétyle (NAc). Par exemple, les antigènes du groupe A diffèrent du groupe B par l'introduction d'un groupement *N*-Acetyl sur le galactose à l'extrémité non réductrice. Si l'on compare l'antigène B Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc (Id. 21) avec l'antigène A Gal**NAc**α1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc (Id. 16), on passe d'une note de C à pas de détection d'interaction avec PA-IL dans les conditions du criblage. Ce résultat est aussi obtenus si l'on compare tous les antigènes du groupe B avec ceux du groupes A. Cette modification est donc défavorable à l'interaction avec PA-IL.

- Influence de la longueur de l'oligosaccharide

Dans les sucres présentant une interaction faible avec PA-IL, l'effet de la longueur de l'oligosaccharide n'est pas clairement identifiable. Par exemple, si l'on compare les résultats obtenus avec les sucres de la famille « Core structure » type I avec le type II, on s'aperçoit que l'effet est inverse. En effet, dans le cas du type I, un allongement semble défavorable à l'interaction avec PA-IL. Cependant, les différences d'interaction sont assez faibles passant de C^- à D. Dans le cas du type II, un allongement de l'oligosaccharide permet d'obtenir la note de B par rapport à C^-.

En revanche, pour des oligosaccharides présentant une forte affinité pour PA-IL comme ceux débutant par Galα1-3Gal, on s'aperçoit que de passer d'un disaccharide à un oligosaccharide composé de 11 résidus (DP 11), l'affinité pour PA-IL reste la même (note B). Dans ce cas, la longueur de l'oligosaccharide n'influence pas l'interaction avec PA-IL (Tableau 4-10).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Core Structure, Type I	Galβ-3GlcNAc	C^-	3	GLY009
	Galβ-3GlcNAcβ-4Gal	D	1	GLY005
Core Structure, Type II	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C^-	6	GLY021
	Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_2$Glc	C^-	7	GLY022
	Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_3$Glc	B	8	GLY023
Disaccharide	Galα1-3Gal	B	85	GLY153
IsoGb3 (iGb3)	Galα1-3Galβ1-4Glc	B	41	GLY070
Ag Galili et Xeno	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	B	42	GLY071
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_2$Galβ1-4Glc	B	45	GLY077
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_3$Galβ1-4Glc	B	46	GLY078
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_4$Galβ1-4Glc	B	47	GLY079

Tableau 4-10 : Influence de la longueur de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IL

4.2.3. Les oligo- et polysaccharides extraits de la biomasse

Environ 30 % des sucres ayant donné une réponse positive lors du criblage sont des oligo- et polysaccharides extraits de la biomasse, ils appartiennent soit à la famille des xyloglucanes, soit à celle des galactomannanes.

4.2.3.1. Les xyloglucanes

Les xyloglucanes sont des polysaccharides hemicellulosiques qui sont présents dans la paroi des cellules végétales de toutes les plantes supérieures. Ils sont composés d'une chaine latérale constituée d'unités de β-D-Glucose reliées entre elles par une liaison β1-4. Trois quarts de ces unités ont une ramification composée de α-D-Xylose rattachée en position 6. Certaines ramifications peuvent être modifiées avec du β-D-Galactose en position 2 sur lequel peut être aussi rattaché du α-L-Fucose en position 2 (Figure 4-8).

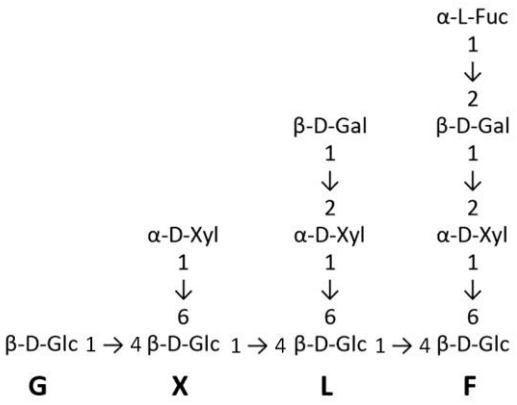


Figure 4-8 : Représentation des xyloglucanes avec leur nomenclature associée. Adapté de (Fry et al., 1993).

Les trois xyloglucannes dont le criblage montre une interaction avec PA-IL ont tous eu la note de D signifiant qu'ils interagissent que faiblement avec PA-IL (Id. 117, 119 et 120). Leur structure exacte n'est pas connue, il s'agit d'un mélange des unités G, X, L et F. Sachant que PA-IL reconnait le galactose, il est très probable qu'elle interagisse avec le β-D-Galactose terminal retrouvé sur l'unité L.

4.2.3.2. Les galactomanannes

Les galactomanannes sont quant à eux des polysaccharides qui sont abondamment présents dans les graines de certains légumes et composés d'une chaine principale de β-D-Mannose reliés entre eux par une liaison β1-4 et ramifiés avec du α-D-Galactose rattaché en position 6. Trois polysaccharides galactomannanes issus des graines de caroubier (gomme de caroube), de *Cyamopsis tetragonolobus* (gomme de guar) ou de fenugrec ont été étudiés (Figure 4-9).

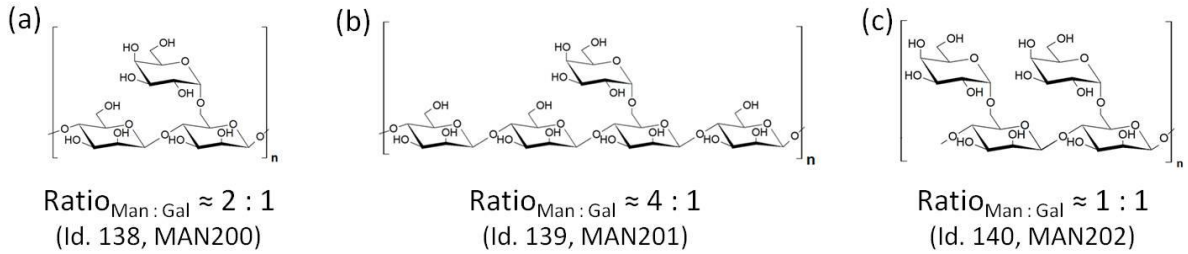


Figure 4-9 : Représentation des trois galactomannanes polysaccharides présents dans la bibliothèque de sucres, Id.138 (a), Id.139 (b) et Id.140 (c).

Comme expliqué dans le chapitre 2, ces galactomannanes ne sont pas monodisperses en terme de poids moléculaire ce qui ne permet pas de calculer la molarité des solutions. Les solutions sont donc en concentration massique. Ils ont tous les trois montré une inhibition totale de l'interaction galactocluster/PA-IL dès la plus faible concentration utilisée (5 mg/L) signifiant qu'ils ont une forte affinité pour PA-IL (note A). Des oligosaccharides de galactomananne ont

également été testés. Trois d'entre eux sont issus de l'hydrolyse du polysaccharide ayant un $ratio_{Man:Gal}$ de 4 : 1 (Id.139, Figure 4-9b) et varient en fonction de leur degré moyen de polymérisation, DP= 3, 5 ou 9 (Id. 141 à143). Le degré de polymérisation (DP) étant le nombre de monosaccharides constituant l'oligosaccharide. Le degré de polymérisation de ces trois oligosaccharides est un DP moyen permettant de se rendre compte des structures majoritairement présentes. Néanmoins, il n'est pas exclu que d'autres structures de DP proches soient aussi présentes. Par exemple, pour l'oligosaccharide Id.141 possédant un DP moyen de 3, deux trisaccharides issus de l'hydrolyse du polysaccharide Id. 139 (Figure 4-9b) sont majoritairement présents dans le produit, mais il peut également y avoir d'autres structures comme des di- et tetrasaccharides (DP 2 ou 4). Enfin, trois autres oligosaccharides dérivant des galactomannanes ont aussi été testés, la structure de ceux-ci est bien caractérisée et possède donc un DP précis (Id. 144 à146) (Tableau 4-11).

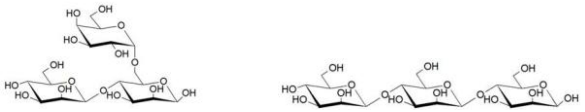
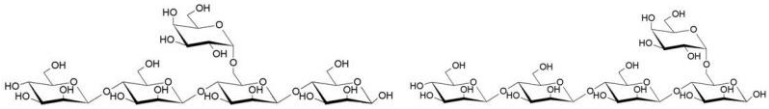
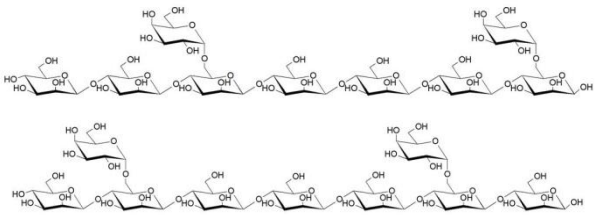
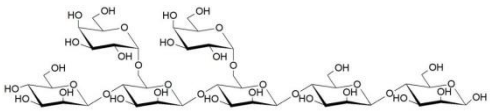
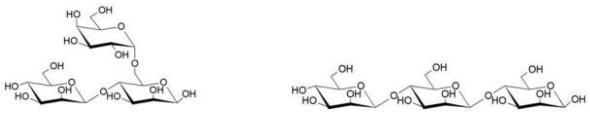
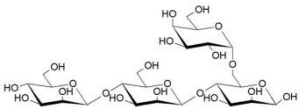
DP	Structure	Id.	Réf.
≈ 3		141	MAN213
≈ 5		142	MAN215
≈ 9		143	MAN219
7		144	MAN300
3		145	MAN400
4		146	MAN500

Tableau 4-11 : Représentation des différentes structures de galactomannanes oligosaccharides avec leur degré de polymérisation (DP) associé.

L'affinité de ces oligosaccharides vis-à-vis de PA-IL a été testée avec des concentrations massiques puisque les trois premiers oligosaccharides (Id. 141 à 143) possède une dispersité de DP ne permettant pas de calculer la molarité des solutions. Néanmoins, en prenant en compte le plus petit oligosaccharide (DP 3, MM = 504 g/mol), il peut être déduit que la plus forte concentration massique (5 g/L) utilisée équivaut à 10 mM d'oligosaccharide. Avec ces concentrations, ces oligosaccharides type galactomannane ont obtenu la note de B à l'exception de celui ayant un DP moyen de 9 qui a obtenu la note de A. La figure 4-10 présente les résultats d'inhibition de l'interaction G_{fort}/PA-IL par ces oligosaccharides.

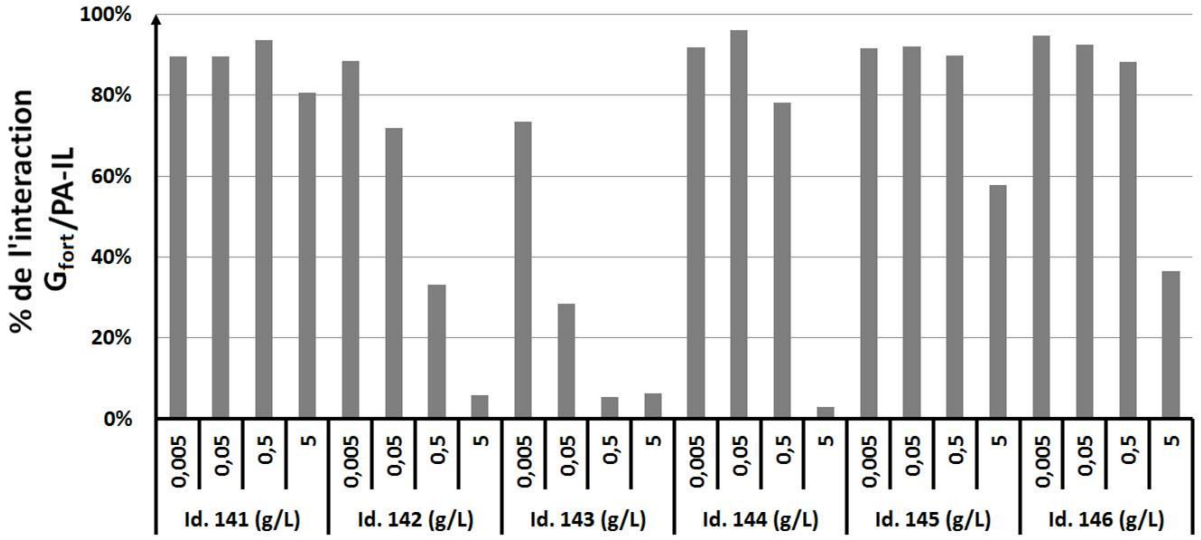


Figure 4-10 : Potentiels d'inhibition de l'interaction galactocluster de réf. G_{fort} avec PA-IL par les différents oligosaccharides type galactomannane.

Dans un premier temps, il peut être remarqué que l'oligosaccharide Id. 141 (Manβ1-4(Galα1-6)Man) est pour lequel le potentiel d'inhibition de l'interaction G_{fort}/PA-IL est le plus faible par rapport aux autres galactomannanes. Cependant, il est observé à 5 g/L ou 10 mM, une faible baisse de l'interaction G_{fort}/PA-IL signifiant qu'à cette concentration, il est capable de rentrer en compétition avec le galactocluster de réf. G_{fort} pour lier la PA-IL. De plus, avec le galactocluster de réf. G_{moyen}, il a pu être observé que le galactomannane Id. 141 empêche totalement l'interaction G_{moyen}/PA-IL à 100 µM alors que les disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal (Id. 85 et 86) ne l'empêchent que partiellement. Les oligosaccharides type galactomannane ont donc plus d'affinité pour PA-IL que ces disaccharides et de manière générale que les autres oligosaccharides ayant obtenu la note de B. L'oligosaccharide Id. 141 n'étant pas multivalent (présentation d'un seul galactose), il semblerait donc que le gain d'affinité soit lié à la liaison Galα1-6. Cette liaison semble donc plus favorable qu'une liaison Galα1-3 et Galα1-4 pour interagir avec PA-IL comme le montre certaines études sur le mélibiose (Galα1-6Glc) (Blanchard et al., 2014; Chen et al., 1998; Nurisso et al., 2010).

Les oligosaccharides Id. 141 et 145 (Tableau 12) présentent les mêmes structures, cependant leurs réponses vis-à-vis de PA-IL ne sont pas les mêmes. En effet, Id. 145 présente plus d'affinité pour PA-IL que l'Id. 141. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'oligosaccharide Id. 141 possède de la dispersité ce qui n'exclu pas d'avoir d'autres structures saccharidiques et donc une plus faible proportion de résidus galactoses.

Si l'on compare les oligosaccharides Id. 145 et Id. 146, on s'aperçoit que ce dernier à légèrement plus d'affinité pour PA-IL. En effet, à 5 g/L, Id. 146 permet une inhibition de plus de 60 % de l'interaction G_{fort}/PA-IL alors que l'Id. 145 seulement d'environ 40 %. Id.146 possédant un plus fort poids moléculaire que l'Id. 145, ce résultat est d'autant plus vrai en concentration molaire. En effet, pour une même concentration massique, la concentration molaire de Id. 146 est inférieure à Id. 145. L'Id. 145 est constitué de deux trisaccharides dont un seul présente un résidu galactose alors que chaque oligosaccharide de l'Id.146 présente un résidu galactose, exaltant ainsi l'interaction de ce sucre avec PA-IL.

Pour les oligosaccharides (Id.141 à 143) issus de l'hydrolyse du polysaccharide ayant un $ratio_{Man:Gal}$ de 4 : 1 (Id. 139), on s'aperçoit que l'interaction avec PA-IL augmente avec le degré de polymérisation. En effet, à 0.5 g/L d'oligosaccharide, une inhibition de plus de 90 % de l'interaction G_{fort}/PA-IL est observée avec l'oligosaccharide présentant un DP moyen de 9 (Id. 143), d'environs 70 % pour celui ayant un DP moyen de 5 (Id. 142) et enfin de 15 % avec un DP moyen de 3 (Id. 141). Ces résultats ont été obtenus en utilisant des concentrations massiques mais ils seraient aussi valables en utilisant des concentrations molaires. En effet, l'oligosaccharide ayant un DP moyen de 9 (Id. 143) possède un plus haut poids moléculaire global que celui ayant DP moyen de 5 ou de 3. En regardant la structure de ces trois oligosaccharides (Id. 141 à 143), on s'aperçoit que celui ayant un DP moyen de 9 possède deux galactoses ramifiés à la chaine latérale et séparés de trois mannoses alors que les autres ne possèdent qu'un seul galactose. La probabilité d'interaction avec PA-IL est donc plus grande avec cet oligosaccharide.

Enfin, ce résultat peut être comparé avec celui obtenu pour l'oligosaccharide Id. 144 qui présente également deux galactoses ramifiés sur deux mannoses consécutifs de la chaîne latérale. Bien qu'il possède un plus faible poids moléculaire donc une plus forte molarité à 0.5 g/L que l'oligosaccharide ayant un DP moyen de 9 (Id. 143), son affinité pour PA-IL est plus faible que ce dernier. Il peut alors être supposé que les deux galactoses sont trop proches, ce qui entraine de la gêne stérique pour la reconnaissance par PA-IL et qu'un seul des deux galactoses n'est réellement reconnu par PA-IL.

4.2.4. Discussion - conclusion

Le criblage de 156 sucres provenant de l'OligoTech® vis-à-vis de PA-IL a révélé que parmi les antigènes des groupes sanguins du système ABO, PA-IL interagit préférentiellement avec les antigènes B, faiblement avec les antigènes A et pas avec les H. Le criblage a aussi montré que PA-IL reconnait les antigènes du système sanguin dit P comme l'antigène P^k (Gb3 : Galα1-4Galβ1-4Glc) avec qui elle interagit fortement. De manière similaire, le criblage a aussi montré que PA-IL interagit fortement avec les oligosaccharides de type «Galα1-3Gal » dont notamment l'oligosaccharide iGb3 (Galα1-3Galβ1-4Glc). Enfin, le criblage a révélé que les disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal avaient permis une interaction avec PA-IL aussi bonne que celles des oligosaccharides, Gb3 et iGb3. Ces observations avaient aussi été faites par d'autres équipes et en utilisant diverses méthodes comme l'hémagglutination d'érythrocytes, le test ELLA ou le test glycoarray du « Consortium for Functional Glycomics » (Blanchard et al., 2008; Chen et al., 1998; Gilboa-Garber et al., 1994; Lanne et al., 1994).

Lors de ce criblage, il a également pu être remarqué que les polysaccharides type galactomannane interagissent très fortement avec PA-IL. Les oligosaccharides issus de leur dépolymérisation sont d'ailleurs les meilleurs candidats pour interagir avec PA-IL comparé aux autres oligosaccharides testés. En effet, d'après nos résultats ceux-ci semblent avoir une activité plus de 10 fois supérieure à celles de l'antigène Pk (Gb3), de l'oligosaccharide iGb3 ou encore des disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal. De récentes études menées sur des polysaccharides naturels ont aussi montrées par des tests d'inhibition d'hémagglutination le potentiel des galactomanannes (gomme de caroube et gomme de guar) pour interagir avec PA-IL. Il a également été montré que la gomme de guar pouvait empêcher la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Grishin et al., 2013; Zinger-Yosovich and Gilboa-Garber, 2009).

Ce criblage a aussi fait ressortir que certains paramètres déstabilisent l'interaction avec PA-IL comme :

- La présence d'une ramification avec un fucose au niveau du deuxième résidu de l'oligosaccharide (juste après l'extrémité non réductrice).
- La modification du galactose à l'extrémité non réductrice par un groupement *N*-Acétyle.

En revanche, le type de liaison osidique porté par le galactose à l'extrémité non réductrice joue un rôle important dans l'interaction avec PA-IL. En effet, nous avons vu que PA-IL préférentiellement lie les structures suivantes :

Galα1-6 > Galα1-4 ≈ Galα1-3 >> Galβ1-4 > Galβ1-3

Ce classement est aussi retrouvé dans la littérature, il a notamment été mesuré par ITC, le K_d des disaccharides Galα1-3Gal, Galα1-4Gal et du mélibiose (Galα1-6Glc) qui sont respectivement de 132, 115 et 39 µM montrant une nette préférence du mélibiose par rapport aux deux autres disaccharides pour interagir avec PA-IL (Blanchard et al., 2014; Imberty et al., 2004; Nurisso et al., 2010). Une étude par modélisation moléculaire des disaccharides Galα1-3Gal, Galα1-4Gal et Galα1-6Gal a, en revanche, montré des énergies potentielles d'interactions similaires autour de -63 kcal/mol. Pour chaque disaccharides, le galactose à l'extrémité non réductrice permettait, via ses hydroxyles en position 3 et 4, la coordination du calcium et la formation de liaisons hydrogènes avec les résidus Tyr36, Asp100, Thr104 et Asn108. Les disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal permettaient également la création de liaisons hydrogènes avec les résidus Asn107, His50 et Gln53 alors que le Galα1-6Gal le permettait seulement avec Asn107 et Gln53 et avait des points de contact avec l'His50 et la Pro51. La cartographie des interactions est présentée en figure 4-11.

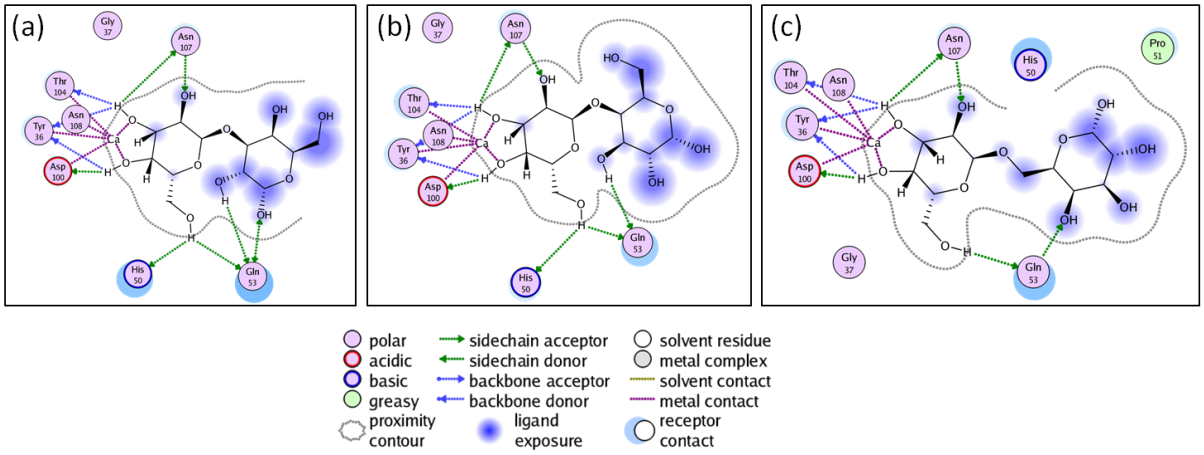


Figure 4-11 : Cartographie des interactions issue de la modélisation moléculaire de PA-IL avec les disaccharides Galα1-3Gal (a), Galα1-4Gal (b) et Galα1-6Gal (c).

Enfin de ce criblage, il a été sélectionné 7 oligosaccharides afin de synthétiser des glycoclusters par nos collaborateurs de l'IBMM. Il s'agit d'oligosaccharides présentant différentes forces d'interaction avec PA-IL (Tableau 4-12).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Core Structure, Type II	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
Core Structure, Type I	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C^-	6	GLY021
Antigènes B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	C	21	GLY038-3
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	24	GLY040-1
Disaccharides	Galα1-3Gal	B	85	GLY153
	Galα1-4Gal	B	86	GLY154
Galactomannane	$[Man\beta1\text{-}4\ Man\beta1\text{-}4(Gal\alpha1\text{-}6)Man\beta1\text{-}4Man]_n$, DP ≈ 9	A	143	MAN219

Tableau 4-12 : Oligosaccharides sélectionnés pour la synthèse de glycoclusters.

Ainsi à partir de 6 de ces oligosaccharides, il a été synthétisé 18 glycoclusters dont leur structure et leur affinité vis-à-vis de PA-IL seront présentées dans le chapitre 5. La synthèse de glycoclusters à partir du galactomannane est en cours.

4.3. Criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IIL

PA-IIL est une lectine soluble tétravalente de *Pseudomonas aeruginosa* qui interagit fortement avec le fucose en présence de deux atomes de Ca^{2+}. PA-IIL est également capable de reconnaitre le mannose avec une plus faible affinité (cf. 1.2.3.2).

4.3.1. Vue d'ensemble des résultats

Le criblage des 156 sucres produits par la société Elicityl vis-à-vis de la lectine PA-IIL a révélé que 36 sucres sont compétiteurs des fucoclusters. Ces sucres ont été classés en fonction de leur affinité pour PA-IIL, 3 ont obtenu la note de A, 6 celle de B, 14 celle de C et 13 celle de D.

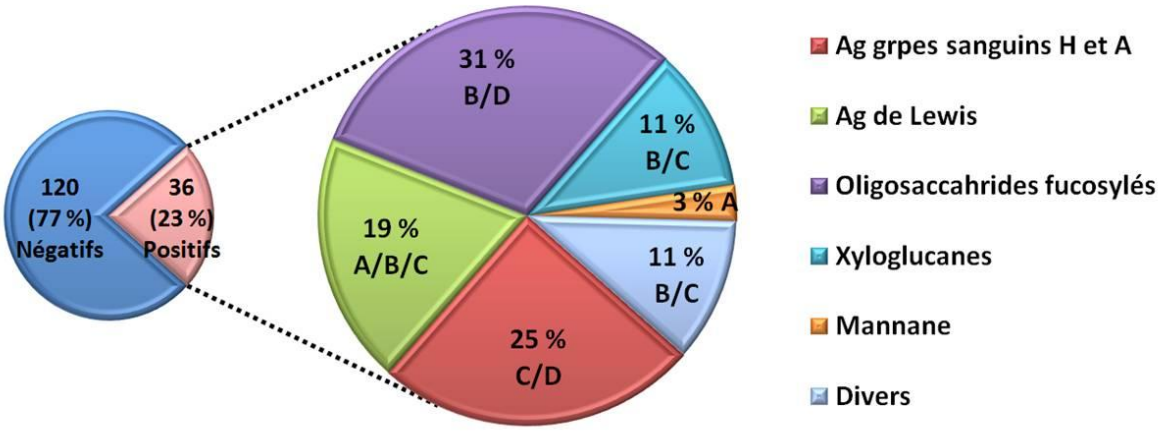


Figure 4-12 : Diagramme des différentes familles de sucres reconnues par PA-IIL avec leur classement associé.

Le diagramme ci-dessus présente les notes majoritairement obtenues pour chaque famille d'oligosaccharides (Figure 4-12). La grande majorité (plus de 85 %) est des oligosaccharides produits par fermentation bactérienne et quelques uns sont des polysaccharides issus de la biomasse comme les xyloglucanes et mannanes.

4.3.2. Les oligosaccharides produits par fermentation bactérienne

Les oligosaccharides produits par fermentation bactérienne et ayant démontré une certaine affinité vis-à-vis de PA-IIL lors du criblage peuvent être regroupés en plusieurs familles : antigènes des groupes sanguins H, et A ; antigènes de Lewis et oligosaccharides fucosylés. Le premier constat est que tous ces oligosaccharides possèdent un fucose à leur extrémité non réductrice ou ramifié sur la chaine latérale de l'oligosaccharide. Ce fucose est responsable de l'interaction avec PA-IIL (cf. Annexe E). Néanmoins, certains oligosaccharides ayant un fucose terminal n'ont pas donné lieu à des interactions mesurables avec PA-IIL. Les paramètres influençant la reconnaissance avec PA-IIL seront expliqués dans le paragraphe 4.3.2.2.

Enfin, il est important de souligner que pour ce criblage, les différences d'affinité avec PA-IIL entre les différents groupes d'oligosaccharides (A, B, C ou D) sont moins marquées que dans le cas du criblage réalisé avec PA-IL, PA-IIL possédant naturellement une forte affinité pour le L-Fucose.

4.3.2.1. Les différentes familles d'oligosaccharides reconnues par PA-IIL

- Antigènes des groupes sanguins H et A

Comme expliqué paragraphe 4.2.2.1, les antigènes des groupes sanguins du système ABO sont des sucres complexes qui sont présents à la surface des globules rouges, de certaines muqueuses et à l'état libre dans certains fluides biologiques comme le sang.

Les antigènes des groupes sanguins H ont tous été faiblement reconnus par PA-IIL (Note C ou D). Ils présentent tous un motif Fucα1-2 à leur extrémité non réductrice qui semble être responsable de l'interaction avec PA-IIL. La longueur de l'oligosaccharide semble avoir peu d'effet sur la reconnaissance avec PA-IIL.

Parmi tous les antigènes du groupe sanguin A, seulement deux (Id. 15 et 77) sont des compétiteurs de l'interaction fucocluster/PA-IIL, ils ont obtenu la note de D signifiant qu'ils interagissent aussi faiblement avec PA-IIL. Ils présentent tout deux un fucose ramifié en α1-2 sur le deuxième résidu de l'oligosaccharide. Hormis Id. 15 et 77, les oligosaccharides présentant un seul fucose ramifié en α1-2 sur le deuxième résidu et un degré de polymérisation (nombre de monosaccharide) supérieur à 3 ne sont pas reconnus par PA-IIL dans les conditions de notre criblage (Antigènes A et B) (Tableau 4-13).

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigènes H	Fucα1-2Gal	C	9	GLY030
	Fucα1-2Galβ1-4Glc	C	10	GLY031-3
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	D	11	GLY032-1
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	D	12	GLY032-2
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	D	13	GLY033-1
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	14	GLY033-2
	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	C	76	GLY127
Antigènes A	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal	D	15	GLY034
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	D	77	GLY128

Tableau 4-13 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des groupes sanguins du système ABO reconnus par PA-IIL.

- Antigènes de Lewis

Ces antigènes appartiennent à un autre système de groupe sanguin, le système Lewis. Ce système est constitué de plusieurs types d'antigènes représentant des oligosaccharides

présents à la surface des érythrocytes (principalement Lewis^{A} et Lewis^{B} chez l'homme), des muqueuses (mucines) ainsi que libres dans certains fluides biologiques comme le plasma.
Les antigènes type Lewis^{X}, Lewis^{Y} et s-Lewis^{X} (Id. 26 à 29) présentent tous un fucose ramifié en α1-3 sur la chaine latérale et ont majoritairement obtenus la note de C. Cette affinité est augmentée dans le cas de la présence de deux fucoses ramifiés en α1-3 sur la chaine latérale (Note B, Id. 27) (Tableau 4-14). Pour ce qui est des antigènes Lewis^{A}, la présence d'un fucose ramifié en α1-4 sur le deuxième résidu de la chaine latérale semble fortement augmenter l'interaction avec PA-IIL. Les deux oligosaccharides de ce type ont obtenu la note de A (Id.30 et 31). Néanmoins, l'ajout d'un résidu Fucα1-2 à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide semble fortement déstabiliser l'interaction avec PA-IIL (Antigène Lewis^{B}, Id.32 ; note C). Il semblerait donc que ce Fucα1-2 crée une gêne stérique ne permettant pas ou peu à PA-IIL d'interagir avec le Fucα1-4 mais seulement au bénéfice du fucose en α1-2. Cependant, cette hypothèse n'est pas vérifiée dans le cas du Fucα1-3 où les deux oligosaccharides, Id. 26 et 28, ont obtenu la même note de C.

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigènes Le^{X}	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	26	GLY050
	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	27	GLY051
Antigène Le^{Y}	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	28	GLY052
Antigène sLe^{X}	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	29	GLY053
Antigènes Le^{A}	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	A	30	GLY054
	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	A	31	GLY055
Antigène Le^{B}	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	C	32	GLY056

Tableau 4-14 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des groupes sanguins du système Lewis reconnus par PA-IIL.

- Oligosaccharides fucosylés

Les oligosaccharides fucosylés possèdent tous un motif lactose «Galβ1-4Glc » fucosylé et appartiennent à trois sous-familles, 3-Fucosyllactose (3-FL) core : Galβ1-4(Fucα1-3)Glc ou 2'2/3-Difucosyllacose (2'2/3-DFL) cores : Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-2/3)Glc (Tableau 4-15). Ces oligosaccharides sont en générale retrouvés dans le lait humain. Les oligosaccharides appartenant à la sous-famille « 3-FL core » ont tous obtenu la note de B. Ces oligosaccharides ont tous un Fucα1-3 ramifié sur le résidu glucose du lactose présent à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide. Comme observé précédemment avec le Lewis^{B} (Id. 32) comparé au

Lewis^{A} (Id. 30), l'ajout d'un deuxième fucose en α1-2 à l'extrémité non réductrice déstabilise l'interaction avec PA-IIL (Id.38, note C à comparé avec Id. 33, note B). Enfin, il semblerait que lorsque ce Fucα1-2 se situe à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide, il ait un effet moins déstabilisant sur l'interaction avec PA-IIL que lorsqu'il s'agit d'une ramification (Id. 38, note C, à comparé avec Id. 39-40, note D).

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
" 3-FL core"	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	33	GLY060
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	34	GLY061
	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	35	GLY062
	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	36	GLY063
	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	37	GLY064
" 2'3DFL core"	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	C	38	GLY066
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	39	GLY067
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	40	GLY068
" 2'2DFL core"	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	C	92	GLY163
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	D	93	GLY164
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	D	94	GLY165

Tableau 4-15 : Les oligosaccharides de la famille des antigènes des oligosaccharides fucosylés reconnus par PA-IIL.

- Divers

Enfin quatre autres oligosaccharides appartenant à diverses familles ont démontré une affinité pour PA-IIL. Ils ont tous en commun le fait d'avoir un Fucα1-2 à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide leur conférant des notes de C ou D (Tableau 4-16).

Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Fuc-GM1	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	D	66	GLY103
DiFucosyl-pentaose	Fucα1-2Galβ1-4Glcβ1-1βGalα2-1Fuc	C	90	GLY161
Globo-H	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	C	72	GLY123
iGbH analogue	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	D	103	GLY201-1

Tableau 4-16 : Les oligosaccharides Fuc-GM1, DiFucosyl-pentaose et de type globo-H (GbH) reconnus par PA-IIL.

4.3.2.2. Les paramètres influençant l'interaction avec PA-IIL

Plusieurs paramètres influencent l'interaction entre PA-IIL et les oligosaccharides présentés ci-dessus, comme la nature de la liaison osidique, la ramification de l'oligosaccharide ou encore sa longueur.

- Influence de la liaison osidique

Dans le panel de sucres criblés, nous ne disposions pas d'un même oligosaccharide variant seulement par son type de liaison osidique pour le fucose. Cependant, quelques grandes tendances peuvent être extrapolées. Le tableau 4-17 donne l'exemple de trois tetrasaccharides ramifiés sur leur deuxième résidu avec du fucose lié en α1-2, α1-3 ou α1-4. Il y apparait qu'une ramification avec un fucose en α1-4 est plus favorable qu'en α1-3 et qu'en α1-2. Ces résultats sont aussi confortés par le fait que tous les oligosaccharides testés possédant un Fucα1-2 n'ont soit pas montré d'affinité soit de manière assez faible (note C ou D) dans les conditions du criblage. Les oligosaccharides possédant quant-à-eux un Fucα1-3 ont majoritairement obtenu la note de B et ceux ayant un Fucα1-4 la note de A montrant de plus en plus d'affinité pour PA-IIL (Tableau 4-17).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigène B	Galα1-3(**Fucα1-2**)Galβ1-4Glc	/	21	GLY038.3
Antigène Le^X	Galβ1-4(**Fucα1-3**)GlcNAcβ1-3Gal	C	26	GLY050
Antigène Le^A	Galβ1-3(**Fucα1-4**)GlcNAcβ1-3Gal	A	30	GLY054

Tableau 4-17 : Influence de la liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IIL.

Il semblerait donc que l'influence de la liaison osidique du fucose avec l'oligosaccharide vis-à-vis de son interaction avec PA-IIL soit le suivant :

Fucα1-4 > Fucα1-3 > Fucα1-2

- Influence du nombre de résidus fucoses

Le tableau 4-18 compare deux à deux, un oligosaccharide ramifié avec un fucose avec son homologue ramifié avec deux fucoses possédant le même type de liaison osidique. On s'aperçoit que dans le cas d'un oligosaccharide difucosylé avec du fucose en α1-3 (Id. 27) ou en α1-2 (Id.94), son affinité vis-à-vis de PA-IIL est augmentée par rapport à un monofucosylé (Id. 26 et 21 respectivement) (Tableau 4-18).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigènes Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	26	GLY050
	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4**(Fucα1-3)**Glc	B	27	GLY051
Ag B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	/	21	GLY038.3
« 2'2DFL core »	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4**(Fucα1-2)**Glc	D	94	GLY165

Tableau 4-18 : Influence du nombre de résidus fucoses possédant le même type de liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IIL.

Maintenant si l'on s'intéresse à un oligosaccharide ramifié avec un fucose en α1-3 ou α1-4 avec son homologue ramifié avec un deuxième fucose en α1-2, le phénomène inverse est observé. En effet, il semble que l'ajout de ce Fucα1-2 n'influence pas l'interaction avec PA-IIL ou au contraire la déstabilise (Tableau 4-19).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigène Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	26	GLY050
Antigène LeY	**Fucα1-2**Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	28	GLY052
« 3-FL core »	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	37	GLY064
« 2'3DFL core »	Galα1-3**(Fucα1-2)**Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	40	GLY068
Antigène Le^A	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	A	30	GLY054
Antigène Le^B	**Fucα1-2**Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	C	32	GLY056

Tableau 4-19 : Influence du nombre de résidus fucoses possédant différents types de liaison osidique sur la reconnaissance avec PA-IIL.

- <u>Influence de la longueur de l'oligosaccharide</u>

Le tableau 4-20 rassemble différents oligosaccharides de la même famille variant par leur longueur. Dans le cas des sucres présentant une interaction faible avec PA-IIL comme les oligosaccharides appartenant aux groupes sanguins H et A, l'effet de la longueur n'est pas significatif puisque dans certains cas l'allongement semble nuire à l'interaction avec PA-IIL (Id.15 à19) et dans d'autres non (Id. 14). Pour ce qui est des oligosaccharides présentant une plus forte affinité pour PA-IIL comme ceux de la famille « 3-FL core », l'allongement de l'oligosaccharide ne semble pas influencer l'interaction avec PA-IIL. Néanmoins, il est difficile de conclure sur cet effet puisque la bibliothèque de sucres à disposition ne permet de donner que ce seul exemple (Id. 33 et 34).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigènes H	Fucα1-2Gal	C	9	GLY030
	Fucα1-2Galβ1-4Glc	C	10	GLY031-3
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	D	12	GLY032-2
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	14	GLY033-2
Antigènes A	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal	D	15	GLY034
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	/	17	GLY036-1
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	/	19	GLY037-1
« 3-FL core »	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	33	GLY060
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	34	GLY061

Tableau 4-20 : Influence de la longueur de l'oligosaccharide sur la reconnaissance avec PA-IIL.

4.3.3. Les polysaccharides issus de la biomasse

Cinq polysaccharides issus de la biomasse ont montré une interaction vis-à-vis de PA-IIL.

4.3.3.1. Les xyloglucanes

Tous les xyloglucanes testés (Id. 117 à 120) sont positifs au criblage vis-à-vis de PA-IIL. Ils ont tous obtenus la note de C ou D signifiant qu'ils ont une assez faible affinité pour PA-IIL. Leur structures sont décrites grâce à la figure 4-8 et présentent toutes le motif « F » se terminant par un Fucα1-2. C'est ce motif qui semble permettre l'interaction avec PA-IIL.

4.3.3.2. Les mannanes

Dans la bibliothèque de sucres, nous disposions de quatre mannanes dont trois sont issus du monde végétale et présentent un enchainement Manβ1-4Man sans ramification. Ces derniers n'ont pas montré d'interaction avec PA-IIL aux concentrations testées (Id. 149, 150 et 152) ce qui implique que PA-IIL ne semble pas reconnaître les résidus de mannose intrachaîne. A noter que le mannane Id. 149 a été solubilisé à 5 g/L dans 5 % de NaOH mais qu'aux concentrations testées pour le cribalge vis-à-vis de PA-IIL, le pH est proche de 7.4 n'affectant pas l'activité de cette lectine. Ce qui n'était pas le cas lors du criblage avec PA-IL (cf. 4.2.1).
En revanche, nous disposions d'un mannane provenant d'un extrait de levures et composé d'un enchainement de Manα1-6Man ramifié avec du mannose en α1-2 ou α1-3 (Id. 151). Ce mannane a montré une très forte affinité avec PA-IIL et a obtenu la note de A. La masse molaire de ce polysaccharide n'étant pas disponible, le test a été réalisé avec des

concentrations massiques correspondant aux molaires si le polysaccharide avait un degré de polymérisation de 20. Le mannane testé ayant au moins ce degré de polymérisation, il peut être déduit qu'il aurait aussi eu cette note si le test avait pu être fait avec des concentrations molaires. PA-IIL interagit donc avec les mannoses ramifiés en α1-2 ou α1-3 de ce polysaccharide. En effet, PA-IIL est une lectine reconnaissant le fucose mais aussi le mannose mais uniquement en position terminal de la chaîne principale ou des ramifications.

4.3.4. Discussion - conclusion

Le criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IIL a révélé que parmi les antigènes des groupes sanguins du système ABO, PA-IIL interagit préférentiellement avec les antigènes H, faiblement avec les antigènes A et pas avec les B. Les antigènes du système des groupes sanguins Lewis sont également tous reconnus par PA-IIL. Il a notamment été montré que les antigènes Lewis^{A} interagissent fortement avec PA-IIL au contraire des autres antigènes Lewis (Lewis^{X}, s-Lewis^{X}, Lewis^{Y} et Lewis^{B}). Enfin, il avait pu être remarqué que PA-IIL interagit avec des oligosaccharides de la famille des fucosyllactoses (FL) présents pour la plupart dans le lait humain avec une préférence pour ceux constitués du motif 3-FL. Entre toutes ces familles, PA-IIL interagit préférentiellement avec les oligosaccharides possédant le motif 3-FL (note B) et les antigènes type Lewis^{A} (note A). La littérature confirme également ces résultats. En effet, ces observations avaient aussi été faites par d'autres équipes et en utilisant diverses méthodes comme l'hémagglutination d'érythrocyte, le test ELLA ou un glycoarray du « Consortium for Functional Glycomics ». De plus, des mesures de calculs de K_d par ITC effectuées avec, les oligosaccharides Lewis^{A} (Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc), Lewis^{X} (Galβ1-3(Fucα1-3)GlcNAc) et 3-FL (Galβ1-4(Fucα1-3)Glc) ont montré une affinité croissante entre le Lewis^{X}, 3FL et Lewis^{A} avec un K_d respectif de 3.44, 0.37 et 0.21 µM (Mitchell et al., 2002; Perret et al., 2005; Topin et al., 2013; Wu et al., 2006). Comme remarqué lors du criblage, la différence d'affinité pour PA-IIL entre le Lewis^{A} (Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal, note A) et le Lewis^{X} (Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal, note C) est importante, alors que ceux-ci ne diffèrent que par la position de la liaison du fucose (Fucα1-4 vs Fucα1-3). La structure du complexe PA-IIL/Lewis^{A} a été résolue par cristallographie et a montré que les trois monosaccharides qui composent le Lewis^{A} interagissent avec la surface de PA-IIL soit directement via des liaisons hydrogènes et de coordination avec le Ca^{2+} soit indirectement en pontant des molécules d'H_2O. En effet, en plus des liaisons de coordination des deux atomes de Ca^{2+} et des liaisons hydrogènes du fucose avec PA-IIL (cf. 1.2.3.2), le résidu GlcNAc

établi une liaison hydrogène entre son hydroxyle en position 6 (O6) et la chaine latérale de l'Asp96 de PA-IIL. De plus, deux molécules d'H_2O permettent de ponter le Lewis^A avec PA-IIL : la première relie les hydroxyles O1 et O2 du fucose avec l'amide de la Thr-98 et la deuxième les hydroxyles O1 et O2 du galactose de la chaine latérale de Ser23 de PA-IIL. Pour ce qui est du Lewis^X, la structure cristalline du complexe PA-IIL/Lewis^X n'est pas résolue. Cependant, il semblerait que la liaison α1-3 du fucose oriente le groupement *N*-Acétyle du glucose à la même position que l'hydroxyle O6 du GlcNAc relié en α1-4 du fucose dans le cas du Lewis A. La liaison hydrogène supplémentaire entre le O6 du GlcNac et l'Asp96 de PA-IIL observé avec le Lewis^A ne serait donc pas présente avec le Lewis^X. Ainsi, le groupement *N*-Acétyle créerait une gêne stérique ce qui déstabiliserait la liaison du Lewis^X avec PA-IIL par rapport au Lewis^A (Perret et al., 2005).

Dans le cas du 3FL (note B), nous avons observé lors du criblage que son affinité est intermédiaire entre le Lewis^X (Note C) et le Lewis^A (Note A). Le 3FL diffère du Lewis^X notamment par le fait que le Glc ne porte pas de groupement *N*-Acétyle en C2, il peut donc être supposé au vu des données de la littérature exposées ci-dessus que dans le cas du 3FL, il n'y a plus de gène stérique et que donc l'interaction avec PA-IIL est favorisée. Il est ensuite difficile de conclure sur le fait qu'une liaison hydrogène soit possible comme il est observé avec le Lewis^A. Néanmoins, les affinités de ce dernier et du 3FL vis-à-vis de PA-IIL sont assez similaires en considérant les K_d mesurés par ITC.

Lors de ce crible, il a également pu être remarqué que le polysaccharide mannane extrait de levures interagit très fortement avec PA-IIL. Il s'agit d'un polysaccharide constitué d'une chaine latérale de résidus mannoses reliés entre eux par des liaisons β1-4 et ramifiés avec des résidus mannoses en α1-2 et α1-3. Cette observation est confirmée par la littérature où de tels mannanes ont inhibé l'hémagglutination des érythrocytes type H par PA-IIL (Zinger-Yosovich et al., 2010). Bien que le mannose présente moins d'affinité que le fucose pour PA-IIL, sa présentation en nombre important par le polysaccharide permet d'obtenir de très fortes interactions. Il est difficile de juger, s'il s'agit d'une interaction multivalente ou simplement d'une augmentation de la probabilité d'interaction avec PA-IIL. En effet, la masse molaire ainsi que le taux de ramification de ce polysaccharide n'étant pas connu, il n'est pas possible de rationaliser l'interaction par rapport au nombre de ramifications mannoses portés par le polysaccharide.

Enfin de ce criblage, il a été sélectionné 5 oligosaccharides afin de synthétiser des glycoclusters par nos collègues de l'IBMM. Il s'agit d'oligosaccharides présentant différentes forces d'interactions avec PA-IIL (Tableau 4-21).

Nom	Structure	Note	Id.	Réf.
Antigène Le^B	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	C	32	GLY056
Antigène sLe^X	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	29	GLY053
Antigène Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	26	GLY050
3-Fucosyllactose (3FL)	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	33	GLY060
Antigène Le^A	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	A	30	GLY054

Tableau 4-21 : Oligosaccharides sélectionnés pour la synthèse de glycoclusters.

Ainsi, à partir de ces 5 oligosaccharides, il a été synthétisé 55 glycoclusters dont leur structure et leur affinité vis-à-vis de PA-IIL seront présentées dans le chapitre 5.

4.4. Conclusion générale

Dans ce chapitre, il a été décrit la mise en place d'une méthode faisant appel au glycocluster-microarray et qui a permis le criblage de 156 sucres vis-à-vis de deux lectines de *Pseudomonas aeruginosa* : PA-IL et PA-IIL. Le criblage a permis d'identifier 44 sucres capables d'interagir avec PA-IL et 36 avec PA-IIL. De ces deux criblages, trois sucres sont identiques signifiant qu'ils peuvent à la fois interagir avec PA-IL et PA-IIL. Deux de ces sucres (Id. 15 et Id. 26) ont une faible affinité pour ces lectines alors que l'Id. 37 (Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc) a une bonne affinité pour celles-ci. Il est donc un candidat intéressant pour cibler simultanément PA-IL et PA-IIL.

Le criblage a aussi fait ressortir que PA-IL interagit préférentiellement avec les galactomannanes et les oligosaccharides présentant le motif Galα1-3Gal comme les antigènes du système sanguins P. Pour PA-IIL, le test a révélé que cette lectine interagit fortement avec les antigènes $Lewis^A$ ainsi qu'avec un polysaccharide mannane extrait de levures. Ces polysaccharides type galactomannane et mannane présentent une forte affinité pour PA-IL et PA-IIL respectivement et ont l'avantage de n'être pas ou peu toxiques puisque certains d'entre eux sont utilisés comme additifs alimentaires (épaississant, gélifiant).

De plus, les résultats obtenus pour chacun des deux criblages (PA-IL et PA-IIL) sont en accord avec la littérature ce qui valide la méthode employée pour réaliser ces criblages. Cette méthode consiste à réaliser une compétition entre des glycoclusters de référence immobilisés sur le microarray et des sucres libres dans le milieu pour interagir avec la lectine testée.

Bien que cette méthode de criblage soit plus gourmande en matériel que les méthodes plus conventionnelles de criblage sur microarray, elle présente plusieurs avantages :

- les sucres ne sont pas modifiés pour leur immobilisation
- l'interaction entre les sucres et la lectine se fait en solution évitant le phénomène d'effet cluster de surface (cf. 3.1).

Néanmoins, le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite l'utilisation de glycoclusters de référence dont l'affinité pour la lectine testée doit être bien caractérisée, rendant impossible le criblage de la bibliothèque vis-à-vis de lectine n'ayant pas de glycoclusters de référence identifiés.

L'analyse des résultats de chaque criblage a été faite en comparant les structures de chaque oligosaccharide manuellement. Cependant, l'utilisation des outils de la bioinformatique afin de réaliser une analyse sans apriori a été une voie envisagée. Des contacts ont été pris avec les auteurs du logiciel GlycoSearch, qui est un logiciel permettant une analyse des données issus de glycoarrays, qui n'ont aujourd'hui pas aboutit. Ce logiciel permet notamment une analyse des données issus des glycoarrays du « CFG » et utilise pour cela la ségrégation des données par motifs similaires (Kletter et al., 2013a, 2013b).

Enfin, du criblage des 156 sucres vis-à-vis de PA-IL, 7 oligosaccharides ont été sélectionnés pour réaliser la synthèse de glycoclusters par nos collègues de l'IBMM et 5 pour PA-IIL. Ainsi, il a été synthétisé 18 et 55 glycoclusters dont leur affinité vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL respectivement sera étudiée sur le glycocluster-microarray et présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre 5

Etude d’affinité d’une bibliothèque de glycoclusters ciblant les lectines de PA

5. Etude d'affinité d'une bibliothèque de glycoclusters ciblant les lectines de PA

Dans les chapitres précédents, il a été présenté le glycocluster-microarray développé au laboratoire permettant la caractérisation de l'interaction glycocluster/lectine à travers des mesures de fluorescence, d'IC_{50} et de K_d et l'impact des conditions expérimentales sur ces mesures d'affinité. Il a également été présenté, grâce à ce même outil le glycocluster-microarray, le criblage d'une bibliothèque de 156 sucres vis-à-vis de deux lectines de *Pseudomonas aeruginosa* : PA-IL et PA-IIL. Les résultats de ce criblage ont d'une part dévoilé les motifs saccharidiques qui permettent et influencent l'interaction avec ces lectines et d'autre part permis de sélectionner certains de ces sucres pour la synthèse de glycoclusters par nos collègues de l'IBMM. En parallèle de ces synthèses, il a aussi été construit des glycoclusters ayant comme résidu saccharidique du galactose ou du fucose pour cibler respectivement PA-IL et PA-IIL et possédant différents aglycones. On parle de galactoclusters ou de fucoclusters.

Il sera donc présenté dans ce chapitre, les résultats des analyses d'affinité de différents glycoclusters ciblant ces deux lectines de *Pseudomonas aeruginosa* : PA-IL et PA-IIL. En particulier, il sera détaillé l'influence de la partie saccharidique permettant l'interaction avec la lectine, mais aussi l'influence de la topologie du glycocluster (cœur, valence) et de l'aglycone (Linkers 1 et 2) comme sa nature chimique, sa longueur, sa rigidité,… (Figure 5-1).

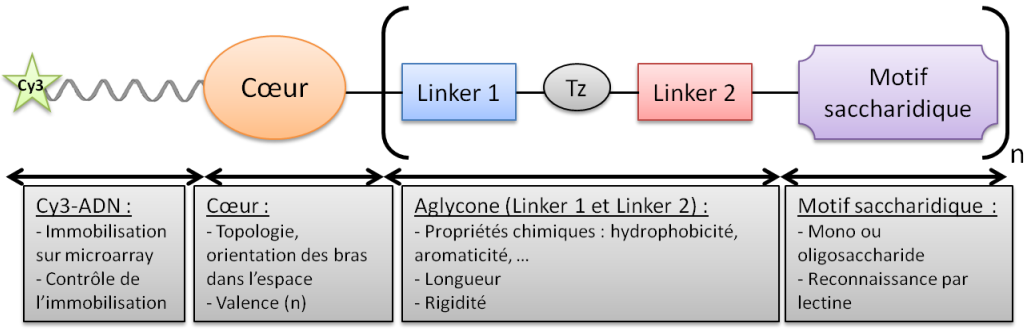


Figure 5-1 : Représentation schématique d'un glycocluster avec les propriétés attribuées au Cy3-ADN, au cœur, à l'aglycone et au motif saccharidique.

Il sera donc investigué différentes combinaisons de ces paramètres (cœurs, linkers 1 et 2, motif saccharidique) afin d'avoir un glycocluster permettant une forte interaction avec les lectines PA-IL et PA-IIL. De plus, il sera présenté les résultats préliminaires obtenus avec d'autres lectines issues du flagelle (FliC, FliD) et des *pili* (PilA, PilY1, CupB6) de *Pseudomonas aeruginosa*.

La structure développée des glycoclusters est présentée en annexe B.

5.1. Etude d'affinité des glycoclusters ciblant PA-IL

Comme expliqué dans le chapitre 1, PA-IL est une lectine soluble de *Pseudomonas aeruginosa* qui reconnait spécifiquement le galactose en présence d'un atome de Ca^{2+}. C'est aussi un facteur de virulence dont la fonction précise n'est pas totalement élucidée mais qui serait impliqué dans la stabilisation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et aurait aussi un rôle cytotoxique vis-à-vis des tissus de l'hôte. La structure de cette lectine est connue et forme un tétramère dont chaque monomère possède un site de reconnaissance du galactose. Ce tétramère peut être assimilé à un parallélépipède où chaque coin possède un site de liaison du galactose (Figure 5-2).

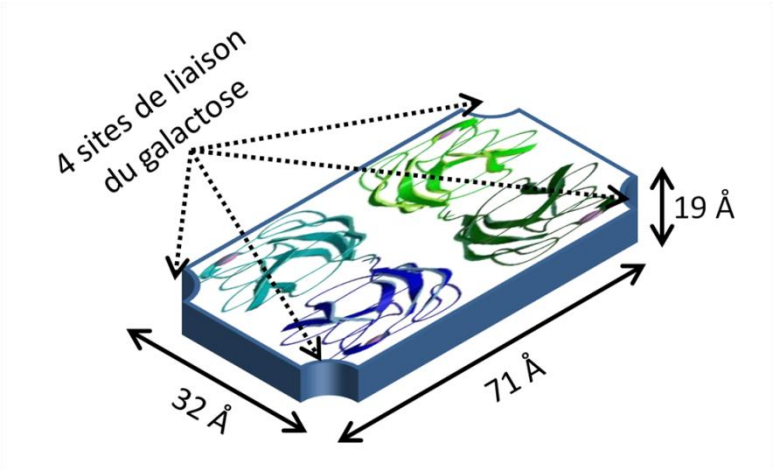


Figure 5-2 : Représentation schématique de la lectine PA-IL

L'étude d'affinité, menée grâce au microarray développé au laboratoire, de différentes structures de glycoclusters ciblant les sites de fixation du galactose de cette lectine va être présentée dans ce paragraphe. Nous allons, tout d'abord, nous intéresser aux glycoclusters fonctionnalisés avec des motifs saccharides issus du criblage de la bibliothèque de sucres. Puis, nous nous intéresserons à des glycoclusters portant des galactosides (galactoclusters). Nous nous focaliserons plus particulièrement sur l'influence de différents linkers 1 et 2.

5.1.1. Glycoclusters présentant différents motifs oligosaccharidiques

Dans le chapitre précédent, il a été présenté le criblage de 156 sucres vis-à-vis de la lectine PA-IL. Parmi les sucres identifiés comme possédant une interaction plus ou moins forte avec PA-IL, sept ont été sélectionnés pour être incorporés dans les glycoclusters (Tableau 5-1).

Nom raccourci	Structure	Note
Core type 2	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal	C^-
LNnT	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C^-
4GrB	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	C
6GrB	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C
Galα1-3Gal	Galα1-3Gal	B
Galα1-4Gal	Galα1-4Gal	B
GalMan	$[Man\beta1\text{-}4\ Man\beta1\text{-}4(Gal\alpha1\text{-}6)Man\beta1\text{-}4Man]_n$, DP ≈ 9	A

Tableau 5-1 : Liste des oligosaccharides sélectionnés à la suite du criblage vis-à-vis de PA-IL

5.1.1.1. Glycoclusters étudiés

Excepté pour le galactomannane (GalMan) dont la production d'oligosaccharides modifiés est en cours, chacun des autres motifs saccharidiques, a été incorporé sur une plateforme Trishydroxymethylethane (THME), ribose (Ribo) et mannose (Man) pour obtenir des valences de 1, 3 et 4, respectivement. Il a donc été synthétisé 18 molécules présentées dans le tableau 5-2.

Id.	Nom	Cœur	Linker 1	Linker 2	Sucre	n
104	**THME-HexTzMNAc-Core type2**	THME	Hex	MNAc	Core type 2	1
94	**Ribo(EG$_4$TzMNAc-Core type2)$_3$**	Ribo	EG$_4$	MNAc	Core type 2	3
64	**Man(EG$_4$TzMNAc-Core type2)$_4$**	Man	EG$_4$	MNAc	Core type 2	4
105	**THME-HexTzMNAc-LNnT**	THME	Hex	MNAc	LNnT	1
95	**Ribo(EG$_4$TzMNAc-LNnT)$_3$**	Ribo	EG$_4$	MNAc	LNnT	3
65	**Man(EG$_4$TzMNAc-LNnT)$_4$**	Man	EG$_4$	MNAc	LNnT	4
106	**THME-HexTzMNAc-4GrB**	THME	Hex	MNAc	4GrB	1
96	**Ribo(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_3$**	Ribo	EG$_4$	MNAc	4GrB	3
66	**Man(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_4$**	Man	EG$_4$	MNAc	4GrB	4
107	**THME-HexTzMNAc-6GrB**	THME	Hex	MNAc	6GrB	1
97	**Ribo(EG$_4$TzMNAc-6GrB)$_3$**	Ribo	EG$_4$	MNAc	6GrB	3
67	**Man(EG$_4$TzMNAc-6GrB)$_4$**	Man	EG$_4$	MNAc	6GrB	4
108	**THME-HexTzMNAc-Galα1-3Gal**	THME	Hex	MNAc	Galα1-3Gal	1
98	**Ribo(EG$_4$TzMNAc-Galα1-3Gal)$_3$**	Ribo	EG$_4$	MNAc	Galα1-3Gal	3
68	**Man(EG$_4$TzMNAc-Galα1-3Gal)$_4$**	Man	EG$_4$	MNAc	Galα1-3Gal	4
109	**THME-HexTzMNAc-Galα1-4Gal**	THME	Hex	MNAc	Galα1-4Gal	1
99	**Ribo(EG$_4$TzMNAc-Galα1-4Gal)$_3$**	Ribo	EG$_4$	MNAc	Galα1-4Gal	3
69	**Man(EG$_4$TzMNAc-Galα1-4Gal)$_4$**	Man	EG$_4$	MNAc	Galα1-4Gal	4

Tableau 5-2 : Glycoclusters et molécules monovalentes étudiés.

Les molécules monovalentes étudiées possèdent un linker 1 long type hexyle (Hex). Les 12 glycoclusters étudiés présentent tous un linker 1 de tetraéthylène glycol (EG$_4$) long et flexible. Enfin, que ce soit les molécules monovalentes ou les glycoclusters, ils possèdent tous un linker 2 de type acétamide (*N*-méthylacétamide) (Figure 5-3).

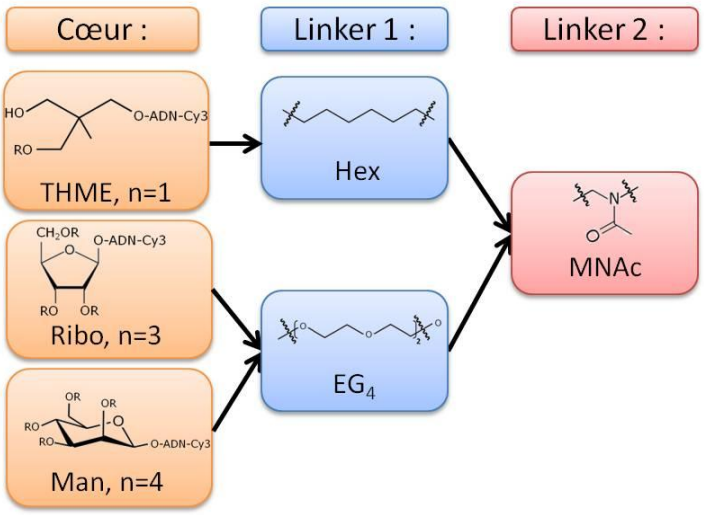


Figure 5-3 : Représentation schématique des différents cœurs et linkers des molécules étudiées.

5.1.1.2. Etude d'affinité vis-à-vis de PA-IL

La figure 5-4 représente la moyenne des intensités de fluorescence à 635 nm (FI_{635}) émises par l'Alexa647_PA-IL interagissant avec les différentes molécules (12 glycoclusters + 6 molécules monovalentes) présentées ci-dessus.

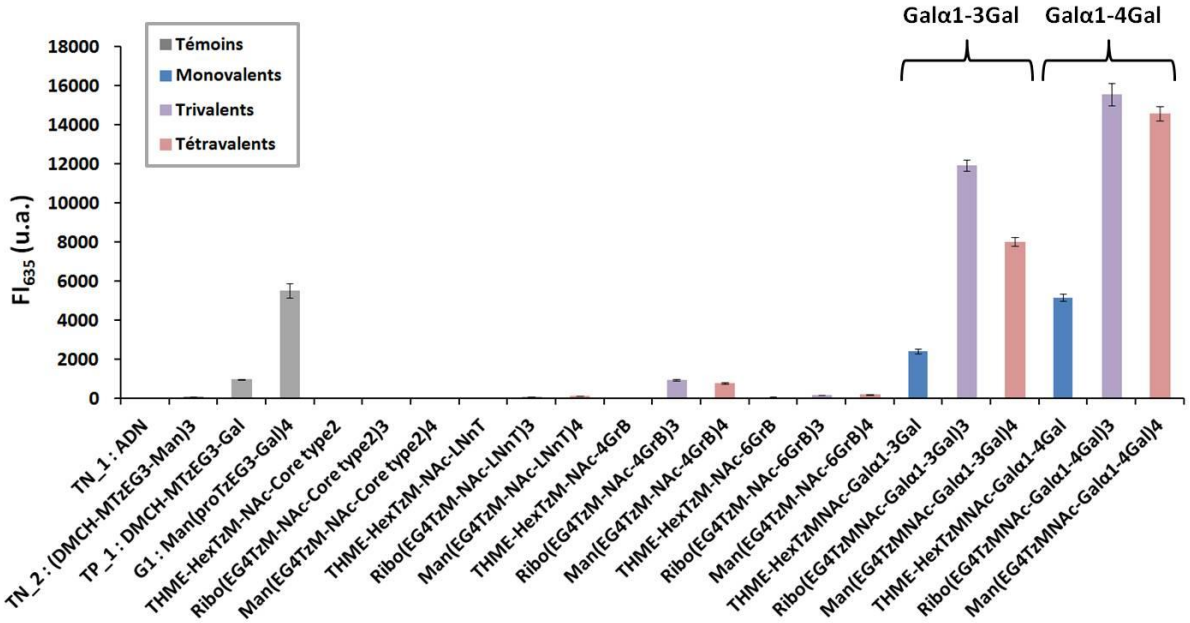


Figure 5-4 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL à 635 nm pour les molécules et glycoclusters étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Afin de valider l'expérience, plusieurs témoins sont mis sur le microarray. Des témoins négatifs sont utilisés de manière à évaluer l'adsorption non spécifique de PA-IL. Ces deux témoins correspondent à un simple brin d'ADN (TN_1 : ADN) et à un glycocluster présentant trois mannoses (TN_2 : $(DMCH\text{-}MTzEG_3\text{-}Man)_3$). La FI_{635} mesurée dans ces conditions est d'environ 50 u.a., il n'y a donc pas d'adsorption non spécifique de PA-IL à la surface du

microarray. Un témoin positif est également mis sur le microarray, il s'agit d'une molécule présentant un galactose (TP_1 : DMCH-MTzEG$_3$-Gal). Le signal de FI$_{635}$ de cette molécule est de 981 u.a. ce qui est 20 fois supérieur aux témoins négatifs, ce qui montre la spécificité de PA-IL pour le galactose. De plus, le galactocluster G1 (Man(proTzEG$_3$-Gal)$_4$, K_d = 398 nM) dont l'affinité vis-à-vis de PA-IL a été présentée dans le chapitre 3, est également ajouté sur le microarray comme référence tétravalente.

- Influence du motif saccharidique

Toutes les molécules ayant le motif saccharidique Core type 2, LNnT, ou 6GrB ont une FI$_{635}$ de l'ordre de celles des témoins négatifs. Dans les conditions expérimentales utilisées, il n'est donc pas détecté d'interaction spécifique avec PA-IL. Le test en solution de l'affinité de ces oligosaccharides pour PA-IL présenté dans le chapitre 4 avait montré une assez faible affinité (Note C). Il peut donc être supposé, ici, que la quantité de molécules immobilisées est trop faible pour permettre la détection d'une interaction avec PA-IL ou que l'immobilisation entraine une gêne de la reconnaissance par PA-IL. Il n'est pas non plus détecté d'interaction avec PA-IL pour la molécule monovalente possédant le motif 4GrB. Il semblerait donc que les quatre oligosaccharides, Core type 2, LNnT, 4GrB et 6GrB possèdent moins d'affinité pour PA-IL que le monosaccharide galactose puisque ils ont tous une FI$_{635}$ inférieure à celle du TP_1. Néanmoins, la présentation multivalente du 4GrB apporte donc un gain d'affinité pour PA-IL. Les glycoclusters, Ribo(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_3$ et Man(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_4$ ont une FI$_{635}$ d'environ 1000 u.a. comparable à celle de TP_1 monovalent.

Toutes les molécules fonctionnalisées avec les disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal sont reconnues par PA-IL. Les molécules monovalentes présentent respectivement des FI$_{635}$ de 2415 et 5166 u.a. ce qui est de 2 à 5 fois plus élevée que le signal obtenu avec TP_1 présentant le monosaccharide galactose. Ceci confirme les résultats obtenus lors du criblage de la bibliothèque de sucres où les disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal avaient obtenu la note de B. La présentation multivalente de ces 2 disaccharides apporte également un gain d'affinité vis-à-vis de PA-IL puisque les molécules monovalentes ont une FI$_{635}$ inférieure à celles des glycoclusters d'un facteur compris entre 4 et 6. Tous les glycoclusters fonctionnalisés avec ces disaccharides ont aussi une FI$_{635}$ supérieure au galactocluster G1 tétravalent. De plus, si l'on compare deux à deux les molécules ne différant que par le motif disaccharide (Galα1-4Gal ou Galα1-3Gal), les FI$_{635}$ mesurées sont plus élevées dans le cas du Galα1-4Gal. Ce disaccaride semble interagir de manière plus favorable que le Galα1-3Gal avec PA-IL. Ces observations sont en accord avec la mesure par ITC du K_d de ces deux

disaccharides. En effet, elles indiquent un *Kd* de 115 µM pour Galα1-4Gal et un K_d de 132 µM pour le Galα1-3Gal (Nurisso et al., 2010).

Donc, l'affinité de PA-IL pour ces différents motifs serait le suivant :

Core type2, LNnT, 6GrB ≤ 4GrB < Gal < Galα1-3Gal < Galα1-4Gal

Ce classement est en accord avec les résultats du test de criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IL présenté dans le chapitre 4.

- Influence de la topologie du glycocluster

Après avoir discuté de l'influence du motif saccharidique, nous allons nous intéresser à l'effet de la topologie du glycocluster sur la reconnaissance avec PA-IL. Pour cela, nous allons discuter des FI_{635} des glycoclusters avec un cœur ribose ou mannose présentant les disaccharides Galα1-3Gal ou Galα1-4Gal. De manière générale, la FI_{635} observée est supérieure pour le cœur ribose à celle observée pour le cœur mannose. Et cela, bien que le cœur ribose ait une valence de 3 alors que le cœur mannose a une valence de 4. Néanmoins, les différences de FI_{635} entre les deux topologies de glycoclusters (Ribo vs Man) sont plus marquées dans le cas des glycoclusters présentant le Galα1-3Gal que ceux présentant le Galα1-4Gal.

Il peut être supposé que le cœur ribose présentant 3 motifs saccharidiques engendre une meilleure présentation des motifs saccharidiques pour la reconnaissance avec PA-IL que le cœur mannose en présentant 4. Une étude de modélisation moléculaire a été faite par le Pr. Gérard Vergoten avec les glycoclusters : Ribo(EG_4TzMNAc-Galα1-3Gal)$_3$ et Man(EG_4TzMNAc-Galα1-3Gal)$_4$ où deux de leurs bras interagissent avec un tétramère de PA-IL. Il a été obtenu de faibles différences en terme d'énergie potentielle d'interaction (ΔE), avec une préférence pour le glycocluster à cœur mannose (ΔE_{moy} = -223 kcal/mol) comparé au cœur ribose (ΔE_{moy} = -215 kcal/mol), ne permettant pas d'expliquer le résultat obtenu sur microarray.

Enfin, lors des travaux de thèse du Dr. Alice Goudot, il avait été observé que pour des glycoclusters présentant le monosaccharide galactose (galactoclusters), la topologie engendrée par le cœur mannose était plus favorable que celle du cœur ribose pour interagir avec PA-IL. Les résultats obtenus ici avec les glycoclusters présentant les disaccharides Galα1-3/4Gal et répétés deux fois vont donc à l'encontre de ceux obtenus avec les galactoclusters. Il semblerait donc que d'un motif saccharidique à l'autre, le cœur permettant la meilleure topologie pour la présentation de ces motifs ne soit pas le même. Il serait intéressant de compléter cette analyse par des mesures d'affinités supplémentaires comme la mesure de K_d.

5.1.2. Galactoclusters présentant différents linkers aromatiques

Nous allons tout d'abord comparer les glycoclusters présentant les disaccharides Galα1-3Gal ou Galα1-4Gal avec des galactoclusters (monosaccharide Gal) dont l'aglycone est aromatique. Comme expliqué dans le chapitre 3 avec le galactocluster G2 (Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$), la présence d'un aglycone aromatique augmente fortement l'interaction avec PA-IL. La co-cristallisation d'un galactoside possédant un cycle aromatique avec PA-IL a montré que c'est une interaction CH-π (T-shaped) entre le cycle aromatique du galactoside et l'His50 de PA-IL qui est à l'origine de la stabilisation de l'interaction du galactose avec PA-IL (Kadam et al., 2013b).

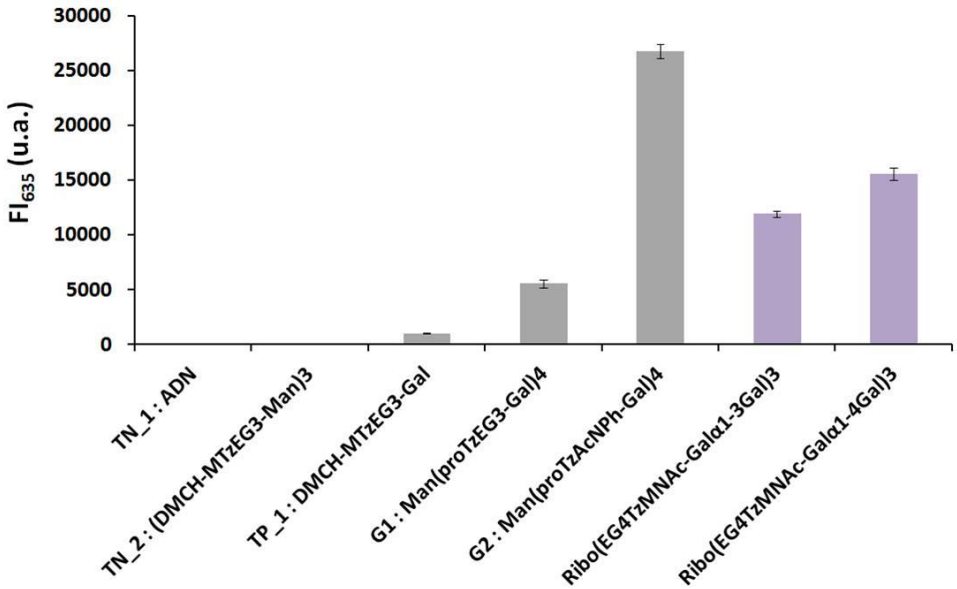


Figure 5-5 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL à 635 nm pour les témoins négatifs (TN_1 et TN_2), positif (TP), les galactoclusters G1, G2 et les glycoclusters à motif disaccharide Galα1-3Gal ou Galα1-4Gal. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Pour les glycoclusters fonctionnalisés avec les disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal, la FI_{635} observée est intermédiaire entre le galactocluster aliphatique G1 (Man(ProTzEG$_3$-Gal)$_4$) et le galactocluster aromatique G2 (Man(ProTzAcNPh-Gal)$_4$) (Figure 5-5). Il a donc été fait l'hypothèse que l'affinité de glycoclusters portant les résidus disaccharidiques Galα1-3Gal et Galα1-4Gal pourrait être exaltée par la présence d'un aglycone aromatique. Une analyse par modélisation moléculaire a été réalisée par le Pr. Gérard Vergoten afin de comparer les énergies potentielles d'interaction (ΔE) entre des bras de type MeTz-MNAc-Galα1-3/4Gal et MeTz-AcNPh-Galα1-3/4Gal. Les résultats et les structures sont présentés dans le tableau 5-3.

Nom	Structure	ΔE (Kcal/mol)
MeTz-MNAc-Galα1-3Gal		-59.9
MeTz-AcNPh-Galα1-3Gal		-67.8
MeTz-MNAc-Galα1-4Gal		-70.5
MeTz-AcNPh-Galα1-4Gal		-75.0

Tableau 5-3 : Structure des différents glycosides MeTz-Linker2-Galα1-3/4Gal associée à leur énergie potentielle d'interaction (ΔE) avec PA-IL obtenue par modélisation moléculaire.

Les énergies potentielles d'interaction pour un même motif disaccharidique sont inférieures de moins de 8 Kcal/mol pour le bras possédant un cycle aromatique ce qui signifie une meilleure interaction avec PA-IL. Néanmoins, l'analyse de ces bras montre que leur cycle aromatique n'est pas impliqué dans une interaction supplémentaire type CH-π (T-shaped) avec les résidus aromatiques de PA-IL comme l'His50. En effet, pour le bras possédant le motif saccharidique Galα1-3Gal, une interaction pseudo π-stacking (T-Shaped) avec l'His50 de PA-IL serait possible avec le deuxième résidu galactose mais pas avec le cycle aromatique qui se trouve trop éloigné de l'His50 (Figure 5-6a). Pour ce qui est du bras portant le motif saccharidique Galα1-4Gal, le groupement phényle est orienté à l'opposé du résidu His50 ce qui ne permet pas de créer une interaction CH-π (T-shaped) supplémentaire (Figure 5-6b).

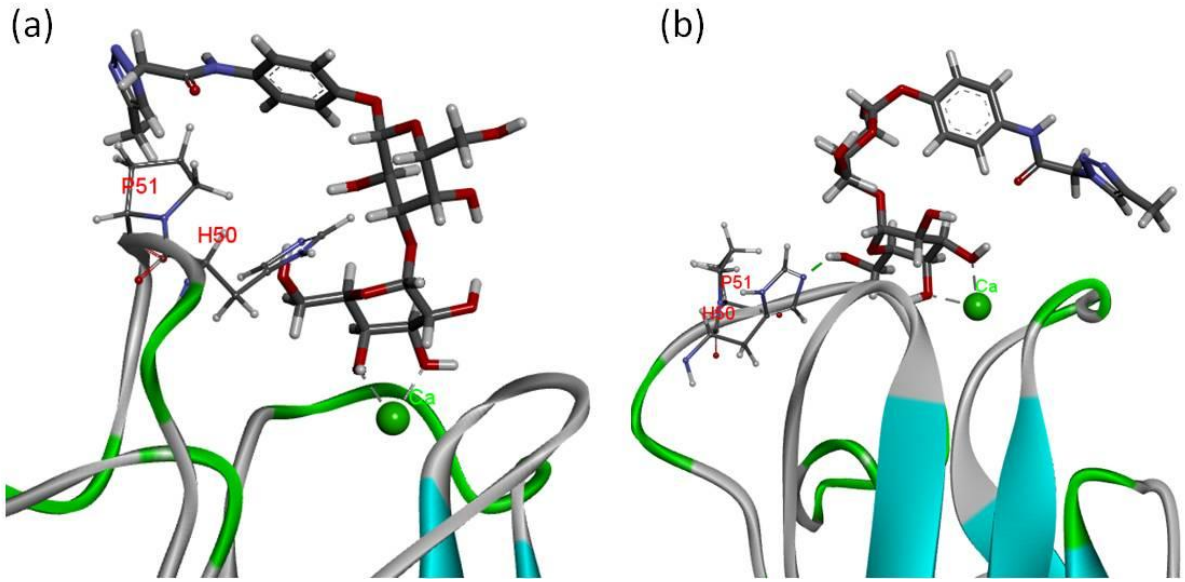


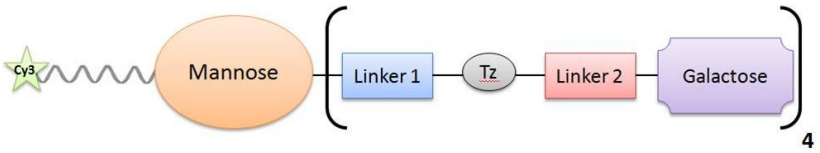
Figure 5-6 : Modélisation moléculaire de l'interaction des glycosides MeTz- AcNPh-Galα1-3Gal (a) et MeTz-AcNPh-Galα1-4Gal (b) avec PA-IL.

De plus, une étude menée en 2014 sur glycoarray avec différents glycoclusters divalents possédant un cycle aromatique type phényle et différents motifs saccharidiques : Gal ou Galα1-2/3/4/6Gal a montré que la molécule la plus favorable pour interagir avec PA-IL était celle possédant le motif monosaccharidique galactose (Novoa et al., 2014). C'est pourquoi au vu de ces résultats, nous avons choisi d'étudier l'influence d'un cycle aromatique avec des glycoclusters fonctionnalisés avec des galactosides (galactoclusters) et non avec les disaccharides Galα1-3Gal ou Galα1-4Gal.

5.1.2.1. Galactoclusters étudiés

Lors de la thèse du Dr. Alice Goudot, différents cœurs permettant différentes topologies de galactoclusters avaient été étudiés sur le microarray par des mesures de fluorescence et d'IC_{50}. Il avait été montré que la topologie du cœur mannose permettait d'obtenir une plus forte affinité vis à vis de PA-IL (Gerland et al., 2014). Des mesures de K_d effectuées sur le microarray avec ces différents galactoclusters et présentées en Annexe F1 sont venues confirmer ces résultats (Ligeour et al., 2015a). C'est pourquoi, il a été étudié 29 galactoclusters qui présentent tous un même cœur mannose de valence 4 portant comme résidu terminal un galactose. Ils présentent ensuite deux à trois linkers 1 différents et treize linkers 2 différents. Les linkers 1 sont des linkers aliphatiques présentant différentes longueurs et flexibilités, il s'agit du propyle (pro), méthylene-diéthylène glycol (EG_2M) et du méthylene-triéthylène glycol (EG_3M). Les linkers 2 présentent quant à eux différents cycles aromatiques comme les hétérocycles (furane, Fur ; thiophène, Thioph ; pyridine, Pyr), le

benzyle (Bn), le phényle (Ph), le biphényle (BiPh) ou encore le napthyle (Napht). Outre la nature du cycle aromatique, la régioisomérie du cycle (pour le linker 2 type *O*-éthyl-*N*-phénylacétamide : AcNPhOEt) a aussi été étudiée. L'effet du bras séparant le résidu galactose du noyau aromatique a aussi été évalué grâce aux galactoclusters possédant un *O*-phényle, un *O*-benzyle ou un *O*-éthylphényle galactoside. Enfin, l'effet d'une fonction ionisable a été investigué grâce à un linker 2 possédant une tyrosine avec soit sa fonction amine soit sa fonction acide carboxylique de libre (Tableau 5-4).



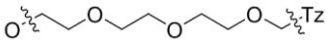
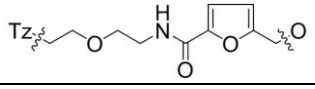
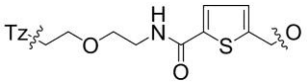
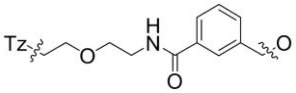
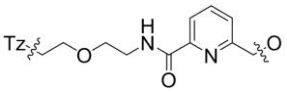
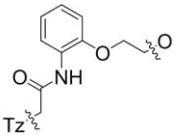
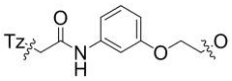
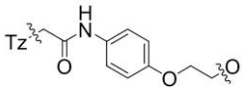
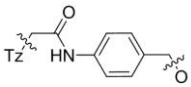
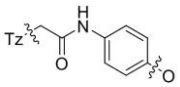
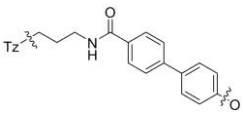
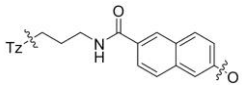
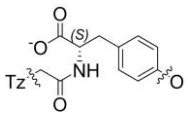
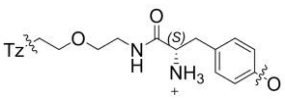
	Nom	Structure	Nbre d'atomes	Propriétés
Linker 1	Pro		3	Rigide
	EG_2M		7	Flexible
	EG_3M		10	Flexible
Linker 2	EG_2NOC**Fur**M		11	hétérocycle
	EG_2NOC**ThioPh**M		11	hétérocycle
	EG_2NOC^3**Bn**		11	Benzyle Isomère méta
	EG_2NOC^3**Pyr**M		11	hétérocycle
	AcN^2**Ph**OEt		8	Phényle Isomère ortho
	AcN^3**Ph**OEt		9	Phényle Isomère méta
	AcN**Ph**OEt		10	Phényle Isomère para
	AcN**Bn**		8	Un cycle
	AcN**Ph**		7	Un cycle
	proNOC**BiPh**		13	Deux cycles
	proNOC**Napht**		11	Deux cycles
	Ac**Tyr**		9	pKa ≈ 3.3, forme COO^-
	EG_2N**Tyr**		13	pKa ≈ 8.0, (20 % NH_2, 80 % NH_3^+)

Tableau 5-4 : Représentation des différents linkers (L1 et L2) avec leurs propriétés respectives. Sur la gauche, le linker 1 est relié au cœur mannose, sur la droite le linker 2 est relié au galactose. Les chiffres en exposant indiquent la régioisomérie du cycle : 2 = ortho, 3 = méta, Ø = para.

Avant de discuter des résultats d'interaction obtenus avec ces différents galactoclusters, il est important d'introduire la notion des interactions impliquant les électrons π entre deux cycles aromatiques (π-stacking). Ces interactions sont des interactions faibles de l'ordre de 1 à 3 kcal/mol. Elles peuvent se faire sous trois conformations : superposée (face to face), perpendiculaire ou T-shaped (face to edge) ou encore parallèle décalée (offset) (Figure 5-7) (Meyer et al., 2003).

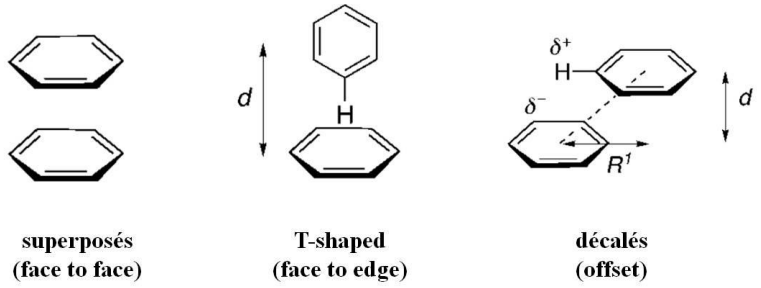


Figure 5-7 : Les différentes conformations d'interaction type π-stacking. Adapté de (Meyer et al., 2003).

Les interactions où les cycles aromatiques sont superposés (face to face) seront favorisées lorsque ceux-ci sont substitués avec des groupements électrophiles ce qui appauvrit la densité électronique des cycles et donc diminue la répulsion des nuages électroniques. Les interactions T-shaped seront quant à elles favorisées lorsque le cycle aromatique présent dans le plan possède des substituants électrophiles et celui perpendiculaire au plan des substituants donneurs d'électrons (Carver et al., 2001).

5.1.2.2. Influence d'un linker présentant différents hétérocycles

Le tableau 5-5 présente les noms des différents galactoclusters étudiés ici.

Id.	Nom	Linker 1	Linker 2
1	Man(**pro**TzEG$_2$NOC**Fur**M-Gal)$_4$	Pro	EG$_2$NOC**Fur**M
2	Man(**EG$_2$M**TzEG2NOC**Fur**M-Gal)$_4$	EG$_2$M	EG$_2$NOC**Fur**M
3	Man(**EG$_3$M**TzEG2NOC**Fur**M-Gal)$_4$	EG$_3$M	EG$_2$NOC**Fur**M
4	Man(**pro**TzEG$_2$NOC**Thioph**M-Gal)$_4$	Pro	EG$_2$NOC**Thioph**M
5	Man(**EG$_2$M**TzEG$_2$NOC**Thioph**M-Gal)$_4$	EG$_2$M	EG$_2$NOC**Thioph**M
6	Man(**EG$_3$M**TzEG$_2$NOC**Thioph**M-Gal)$_4$	EG$_3$M	EG$_2$NOC**Thioph**M
7	Man(**pro**TzEG$_2$NOC^3**Bn**-Gal)$_4$	Pro	EG$_2$NOC^3**Bn**
8	Man(**EG$_2$M**TzEG$_2$NOC^3**Bn**-Gal)$_4$	EG$_2$M	EG$_2$NOC^3**Bn**
9	Man(**EG$_3$M**TzEG$_2$NOC^3**Bn**-Gal)$_4$	EG$_3$M	EG$_2$NOC^3**Bn**
10	Man(**pro**TzEG$_2$NOC^3**Pyr**M-Gal)$_4$	Pro	EG$_2$NOC^3**Pyr**M
11	Man(**EG$_2$M**TzEG$_2$NOC^3**Pyr**M -Gal)$_4$	EG$_2$M	EG$_2$NOC^3**Pyr**M
12	Man(**EG$_3$M**TzEG$_2$NOC^3**Pyr**M -Gal)$_4$	EG$_3$M	EG$_2$NOC^3**Pyr**M

Tableau 5-5 : Galactoclusters étudiés possédant trois linker 1 aliphatiques différents et quatre linker 2 aromatiques différents. Le chiffre 3 en exposant indique la régioisomérie méta du cycle.

Ces galactoclusters présentent trois différents linkers 1 (pro, EG$_2$M ou EG$_3$M) et quatre linkers 2 qui ne varient que par la nature du cycle aromatique : furane (Fur), thiophène (Thioph), l'isomère méta de la pyridine (^{3}Pyr) ou du benzyle (^{3}Bn).

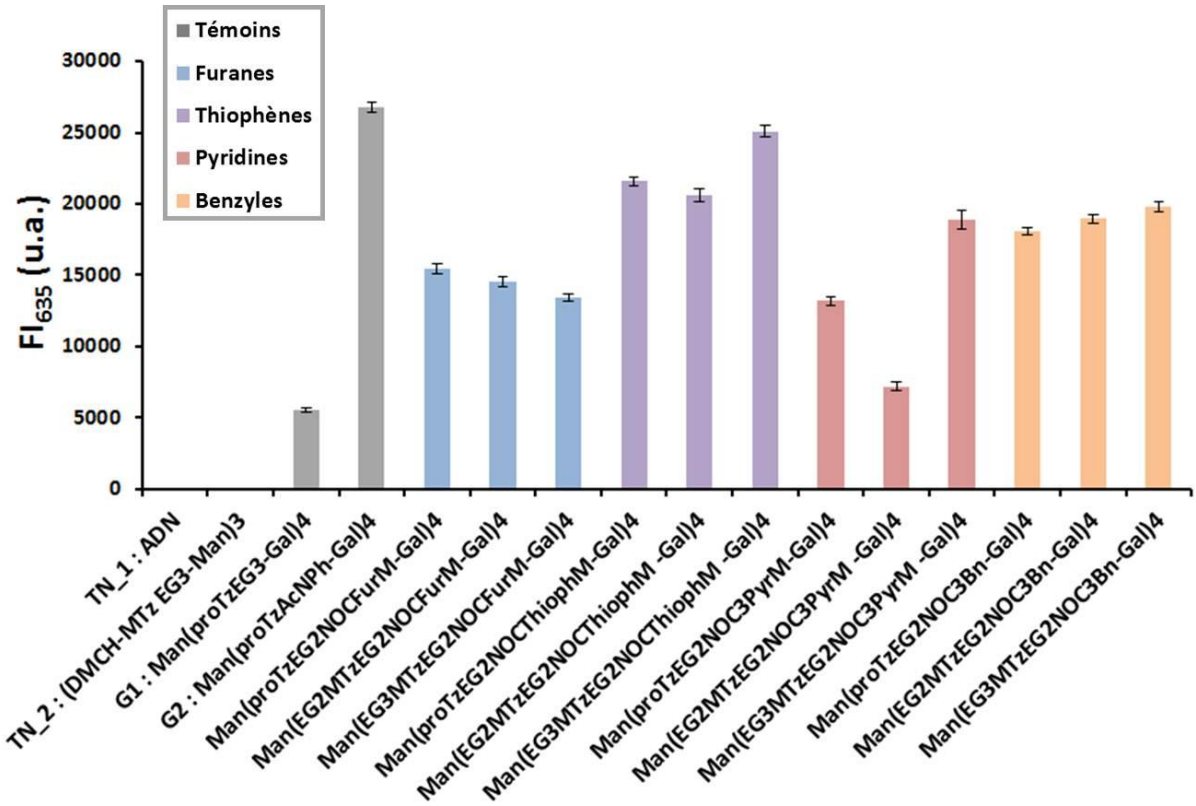


Figure 5-8 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

A l'exception des galactoclusters possédant un linker 2 avec un cycle pyridine, l'interaction avec PA-IL est peu influencée par les différents linker 1 étudiés. Pour un même linker 1, la structure des galactoclusters, Man(**L1**TzEG$_2$NOC**Fur**M-Gal)$_4$, Man(**L1**TzEG$_2$NOC**Thioph**M-Gal)$_4$, Man(**L1**TzEG$_2$NOC^3**Bn**-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzEG$_2$NOC^3**Pyr**M-Gal)$_4$, ne diffère que pour la nature du cycle aromatique porté par le linker 2 (Tableau 5-4). En comparant les FI_{635} et à l'exception du galactocluster Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOC^{3}Pyr)$_4$, le classement vis-à-vis de l'interaction avec PA-IL est le suivant : pyridine < furane < benzyle < thiophène, quelque soit le linker 1 (Figure 5-8). Des mesures de constantes de dissociation ont ensuite été effectuées avec quatre de ces galactoclusters ayant un même linker 1 (EG$_3$M) et variant pour le linker 2. Les galactoclusters présentant un linker 2 avec le cycle furane ou pyridine présentent respectivement un K_d de 202 et 197 nM et ceux ayant un linker 2 avec le cycle benzyle ou thiophène, de 81 et 77 nM. Il a été montré dans le chapitre 3, qu'une mesure de K_d sur microarray possédait un coefficient de variation d'environ de 10 %, ainsi les glycoclusters possédant le cycle furane ou pyridine présentent des affinités équivalentes pour PA-IL, tout comme ceux ayant un cycle benzyle ou thiophène.

Pour un même linker 1, si l'on compare les galactoclusters (Man(**L1**TzEG$_2$NOC**Fur**M-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzEG$_2$NOC**Thioph**M-Gal)$_4$) possédant des hétérocycles à 5 atomes, les résultats de FI$_{635}$ et K_d concordent et indiquent que les galactoclusters possédant un linker 2 de type thiophène interagissent plus fortement avec PA-IL. Le thiophène possède une plus forte aromaticité que le furane grâce à la plus basse électronégativité de l'atome de soufre. Ceci permettrait une plus forte interaction de type π-stacking (T-shaped) avec les résidus aromatiques de PA-IL comme l'His50**.** De même, si l'on compare les galactoclusters Man(**L1**TzEG$_2$NOC^3**Bn**-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzEG$_2$NOC^3**Pyr**M-Gal)$_4$, les résultats de fluorescence et K_d montrent une plus forte interaction avec PA-IL avec un linker 2 type benzyle par rapport à la pyridine. L'azote possède une électronégativité plus forte que le carbone et sa paire d'électron libre ne peut pas être délocalisée dans le cycle aromatique, ce qui confère à la pyridine une plus faible aromaticité et donc un π-stacking (T-shaped) possiblement plus faible.

Afin de vérifier ces hypothèses, une étude de modélisation moléculaire de l'interaction avec PA-IL de quatre galactosides présentant l'un des quatre linkers 2 étudiés ici a été réalisée. Le tableau 5-6 présente les énergies potentielles d'interaction (ΔE) obtenues pour chacun d'entre eux.

		Contribution énergétique des différents résidus de PA-IL (kcal/mol)	
Nom	**ΔE (kcal/mol)**	**His50**	**Pro38**
EG$_2$NOC**Thioph**M-Gal	-81.1	-16.1	/
EG$_2$NOC**Fur**M-Gal	-65.6	/	-6.9
EG$_2$NOC^3**Bn**-Gal	-72.4	/	-5.1
EG$_2$NOC^3**Pyr**M-Gal	-61.4	-4.9	-8.9

Tableau 5-6 : Energies potentielles d'interaction des différents galactosides avec la contribution des résidus His50 et Pro38 de PA-IL.

Plus l'énergie potentielle d'interaction (ΔE) est basse, plus l'interaction avec PA-IL est favorable. D'après ces calculs, le classement des galactosides présentant différents aglycones aromatiques est le suivant : pyridine ≤ furane < benzyle < thiophène. Ceci est en accord avec les données expérimentales présentées ci-dessus. Si l'on s'intéresse seulement aux interactions engendrées par les différents cycles aromatiques, ceux-ci permettent tous une interaction de type π-stacking avec les résidus aromatiques de PA-IL et adoptent principalement la conformation T-shaped. Cette conformation est renforcée lorsque le cycle perpendiculaire au plan (ici cycle aromatique du galactoside) possèdent une forte densité électronique. Ce qui confirme le plus fort potentiel d'interaction du cycle thiophène par

rapport au cycle furane. De plus, la modélisation montre que le cycle aromatique thiophène engendre une interaction de type π-π (T-shaped) avec l'His50 de PA-IL alors que les cycles aromatiques furane et benzyle engendrent une interaction supplémentaire CH-π (T-shaped) avec la Pro38 de PA-IL (Figure 5-9). La proline n'est pas un acide aminé aromatique, cependant elle présente un cycle dont les atomes d'hydrogènes adjacents aux fonctions carbonyle et amide possèdent une densité électronique appauvrit jouant le rôle d'électrophiles pour permettre la formation d'une interaction CH-π T shaped (Zondlo, 2013). Le cycle pyridine adoptent quant-à-lui une conformation plutôt de type parallèle décalée avec les résidus His50 et Pro38. Enfin, les contributions énergétiques des cycles thiophène et furane avec les résidus His50/Pro38 de PA-IL sont en accord avec les résultats expérimentaux.

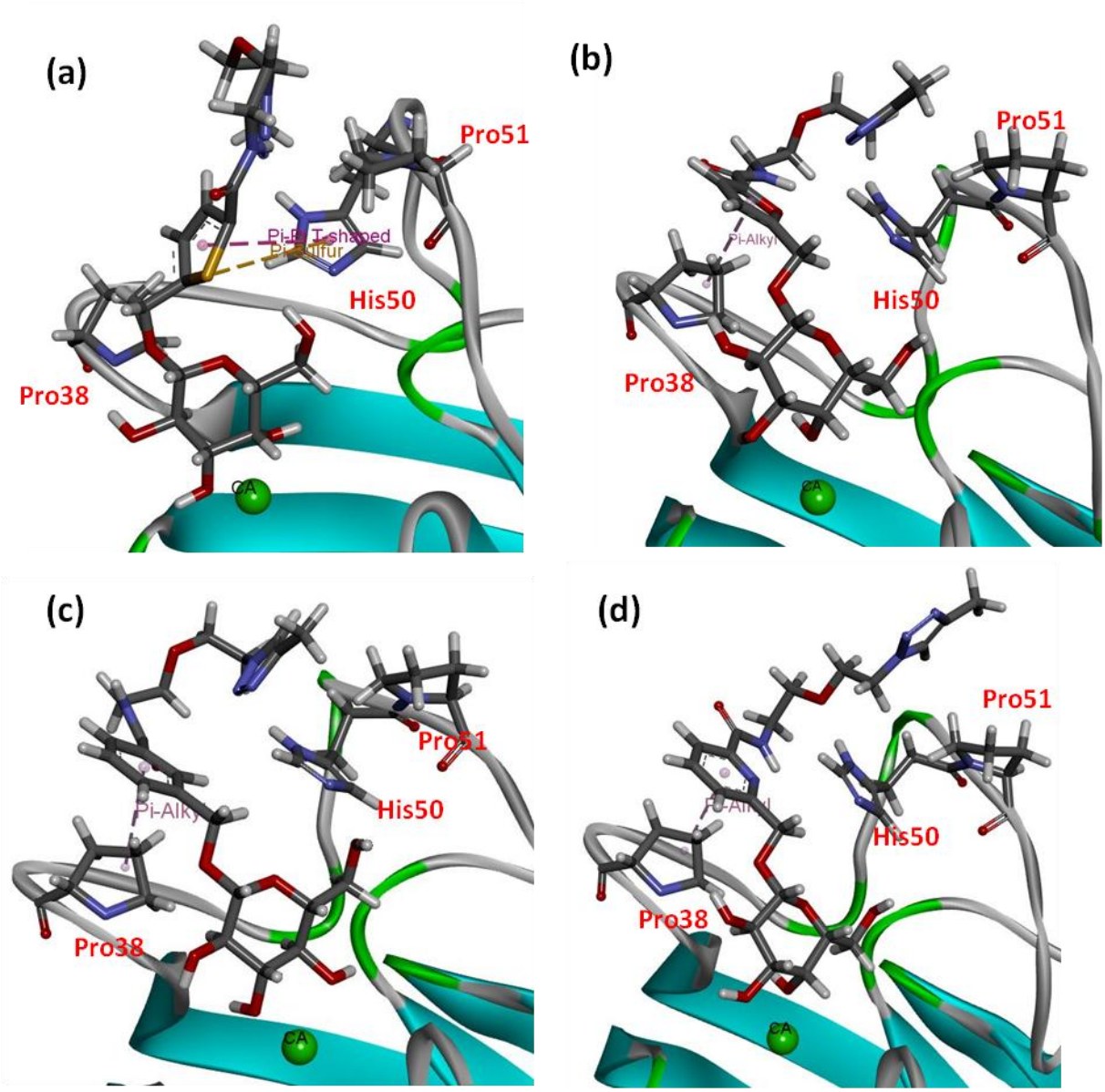


*Figure 5-9 : Modélisation moléculaire de l'interaction des galactosides EG_2NOC**Thioph**M-Gal (a), EG_2NOC**Fur**M-Gal (b), EG_2NOC^3**Bn**-Gal (c) et EG_2NOC^3**Pyr**M-Gal (d) avec PA-IL.*

Néanmoins, tous ces galactoclusters possèdent une plus faible FI_{635} et K_d que le galactocluster G2, Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$ (K_d = 61 nM) possédant un linker 2 acétamide-phényle.

5.1.2.3. Influence d'un linker présentant différents cycles aromatiques

Il va donc maintenant être étudié l'impact de linker 2 possédant différents cycles aromatiques comme le benzyle, le phényle, le biphényle et le naphtyle. Ces galactoclusters présentant tous une affinité assez forte pour PA-IL, afin de pouvoir mieux quantifier cette interaction et les comparer, des mesures d'IC_{50} et de K_d ont été réalisées sur le microarray. De plus, ils possèdent un linker 1 plus ou moins long et flexible type EG_2M ou EG_3M (Tableau 5-7).

Id.	Nom	Linker 1	Linker 2	IC_{50} (mM)	K_d (nM)
13	Man(**EG_2M**TzAcN**Bn**-Gal)$_4$	EG_2M	AcN**Bn**	8,1	99
14	Man(**EG_3M**TzAcN**Bn**-Gal)$_4$	EG_3M	AcN**Bn**	9,1	85
15	Man(**EG_2M**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$	EG_2M	AcN**Ph**	91,6	36
16	Man(**EG_3M**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$	EG_3M	AcN**Ph**	122,7	28
17	Man(**EG_2M**TzproNOC**Napht**-Gal)$_4$	EG_2M	proNOC**Napht**	178,3	14
18	Man(**EG_3M**TzproNOC**Napht**-Gal)$_4$	EG_3M	proNOC**Napht**	68,0	48
19	Man(**EG_2M**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$	EG_2M	proNOC**BiPh**	160,3	20
20	Man(**EG_3M**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$	EG_3M	proNOC**BiPh**	68,9	46

Tableau 5-7 : Galactoclusters étudiés avec leurs valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues sur le microarray.

En comparant les valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues pour chacun des galactoclusters, il est remarqué que les deux analyses sont en accord pour le classement des galactoclusters vis-à-vis de leur affinité pour PA-IL.

Si l'on s'intéresse aux galactoclusters possédant un même linker L1 type EG_2M, il apparait qu'un aromatique possédant un cycle type benzyle possède une plus faible affinité que celui ayant un cycle type phényle puis qu'un aromatique bicyclique type biphényle et enfin que le naphtyle (Bn < Ph < BiPh ≤ Napht).

Quelque soit le linker 1 (EG_2M ou EG_3M), les galactoclusters Man(**L1**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$ présentent plus d'affinité pour PA-IL que les Man(**L1**TzAcN**Bn**-Gal)$_4$. Pour un même linker 1, ces galactoclusters ne diffèrent que par le fait que le cycle aromatique du linker 2 est séparé du galactose par un méthylène dans le cas du benzyle. Les galactoclusters Man(**L1**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$ ont donc leur cycle aromatique directement conjugué à l'hydroxyle du galactose. La paire d'électron libre de l'oxygène peut alors rentrer en résonance avec le cycle aromatique, la

densité du nuage électronique se trouve alors augmentée ce qui dans le cas d'une interaction π-stacking de conformation T-shaped favoriserait l'interaction.

Les galactoclusters Man(**EG$_2$M**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$ et Man(**EG$_2$M**TzproNOC**Napht**-Gal)$_4$ possèdent une affinité environ deux fois plus élevée pour PA-IL que le Man(**EG$_2$M**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$. Néanmoins, l'allongement du linker 1 (EG$_3$M vs EG$_2$M), semble défavorable et c'est alors le galactocluster Man(**EG$_3$M**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$ qui possède le plus d'affinité par rapport à Man(**EG$_3$M**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$ et Man(**EG$_3$M**TzproNOC**Napht**-Gal)$_4$ (BiPh ≈ Napht < Ph). Cette perte d'affinité des galactoclusters aromatiques bicycliques peut être attribuée au fait qu'ils possèdent un linker 1 plus long et flexible d'au moins 6 atomes. Cela augmenterait l'entropie du système et donc défavorise l'interaction avec PA-IL. D'autre part, cela pourrait entrainer un mauvais positionnement des cycles aromatiques vis-à-vis des résidus aromatiques de PA-IL.

A l'exception des galactoclusters avec un cycle benzyle, les galactoclusters possèdent tous un K_d inférieur au galactocluster G2, Man(**pro**Tz**AcNPh**-Gal)$_4$ (K_d = 61 nM). Ils ont donc plus d'affinité pour PA-IL que ce dernier. Les trois meilleurs des galactoclusters permettant une forte interaction avec PA-IL sont le Man(**EG$_3$M**Tz**AcNPh**-Gal)$_4$, Man(**EG$_2$M**Tz**proNOCBiPh**-Gal)$_4$ et le Man(**EG$_2$M**Tz**proNOCNapht**-Gal)$_4$ qui possèdent respectivement un K_d de 28, 20 et 14 nM.

Une étude par modélisation moléculaire des galactosides possédant les différents cycles aromatiques a aussi été menée (Tableau 5-8).

		Contribution énergétique des différents résidus de PA-IL (kcal/mol)	
Nom	**ΔE (kcal/mol)**	**His50-Pro51**	**Pro38**
Bn-Gal	-63.6	/	-8.5
Ph-Gal	-55.8	-5.8	/
BiPh-Gal	-65.7	-8.7	/
Napht-Gal	-66.2	-7.7	/

Tableau 5-8 : Energies potentielles d'interaction des différents galactosides avec la contribution des résidus His50, Pro51 et Pro38 de PA-IL.

A l'exception du benzyle, les énergies potentielles d'interaction avec PA-IL sont en accord avec les résultats expérimentaux et orientent les cycles aromatiques vers les résidus His50 et Pro51. Les résultats de modélisation montrent que les cycles aromatiques phényle et naphtyle permettent une interaction π-stacking (T-shaped) avec l'His50 alors que le biphényle a plutôt tendance à adopté la conformation parallèle décalée (Figure 5-10). Pour ce qui est du

galactoside présentant un benzyle, la modélisation l'oriente vers le résidu Pro38 de PA-IL et adopte une conformation T-shaped. Enfin, la littérature reporte également qu'un galactoside possédant un cycle aromatique type naphtyle (ITC : K_d = 4,2 µM) est plus favorable pour interagir avec PA-IL qu'un ayant un cycle type phényle (ITC : K_d = 8,8 µM) (Kadam et al., 2013b).

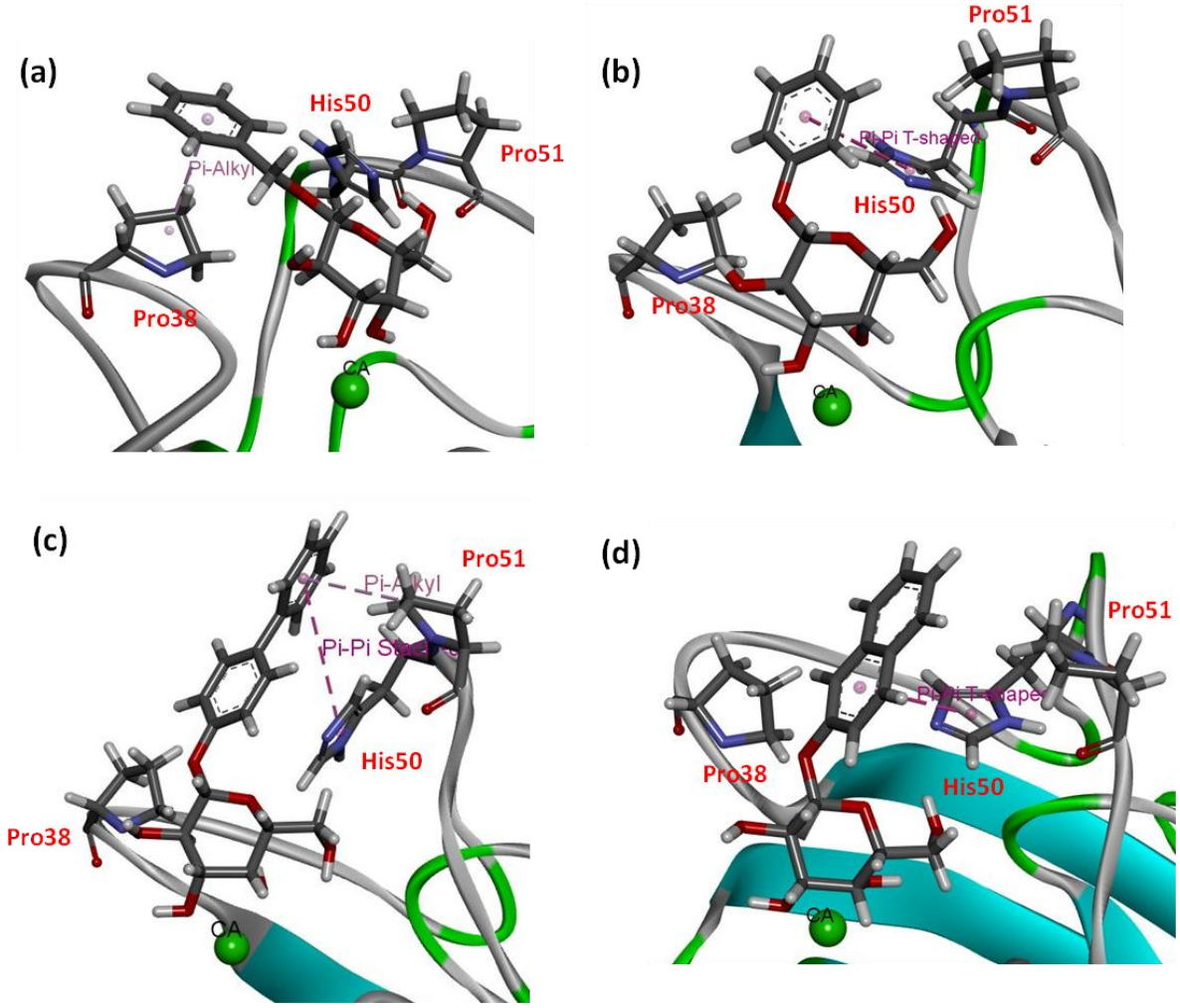


*Figure 5-10 : Modélisation moléculaire de l'interaction des galactosides **Bn**-Gal (a), **Ph**-Gal (b), **BiPh**-Gal (c) et **Napth**-Gal (d) avec PA-IL.*

5.1.2.4. Influence de la régioisomérie du cycle : ortho, méta, para

Le tableau 5-9 présente les noms des différents galactoclusters étudiés ici.

Id.	Nom	Linker 1	Linker 2	
21	Man(**pro**TzAcN^{2}**Ph**OEt-Gal)$_4$	Pro	AcN^{2}**Ph**OEtO	Isomère ortho
22	Man(**EG$_2$M**TzAcN^{2}**Ph**OEt-Gal)$_4$	EG$_2$M	AcN^{2}**Ph**OEtO	
23	Man(**EG$_3$M**TzAcN^{2}**Ph**OEt-Gal)$_4$	EG$_3$M	AcN^{2}**Ph**OEtO	
24	Man(**pro**TzAcN^{3}**Ph**OEt-Gal)$_4$	Pro	AcN^{3}**Ph**OEtO	Isomère méta
25	Man(**EG$_2$M**TzAcN^{3}**Ph**OEt-Gal)$_4$	EG$_2$M	AcN^{3}**Ph**OEtO	
26	Man(**EG$_3$M**TzAcN^{3}**Ph**OEt-Gal)$_4$	EG$_3$M	AcN^{3}**Ph**OEtO	
27	Man(**pro**TzAcN**Ph**OEt-Gal)$_4$	Pro	AcN**Ph**OEtO	Isomère para
28	Man(**EG$_2$M**TzAcN**Ph**OEt-Gal)$_4$	EG$_2$M	AcN**Ph**OEtO	
29	Man(**EG$_3$M**TzAcN**Ph**OEt-Gal)$_4$	EG$_3$M	AcN**Ph**OEtO	

Tableau 5-9 : Galactoclusters étudiés. Les chiffres en exposant indique la régioisomérie du cycle : 2 = ortho, 3 = méta, Ø = para.

Ces galactoclusters présentent un linker 2 : *O*-éthyl-*N*-phénylacétamide où les groupements acétamide et *O*-éthyle sont substitués en ortho (^{2}Ph), méta (^{3}Ph) ou para (Ph) du phényle. De plus, pour chacun de ces isomères, l'impact d'un linker plus ou moins long et flexible est représenté à travers le linker 1 : pro, EG$_2$M puis EG$_3$M. La figure 5-11 représente la moyenne des intensités de fluorescence à 635 nm FI$_{635}$ émises par l'Alexa647_PA-IL interagissant ces galactoclusters.

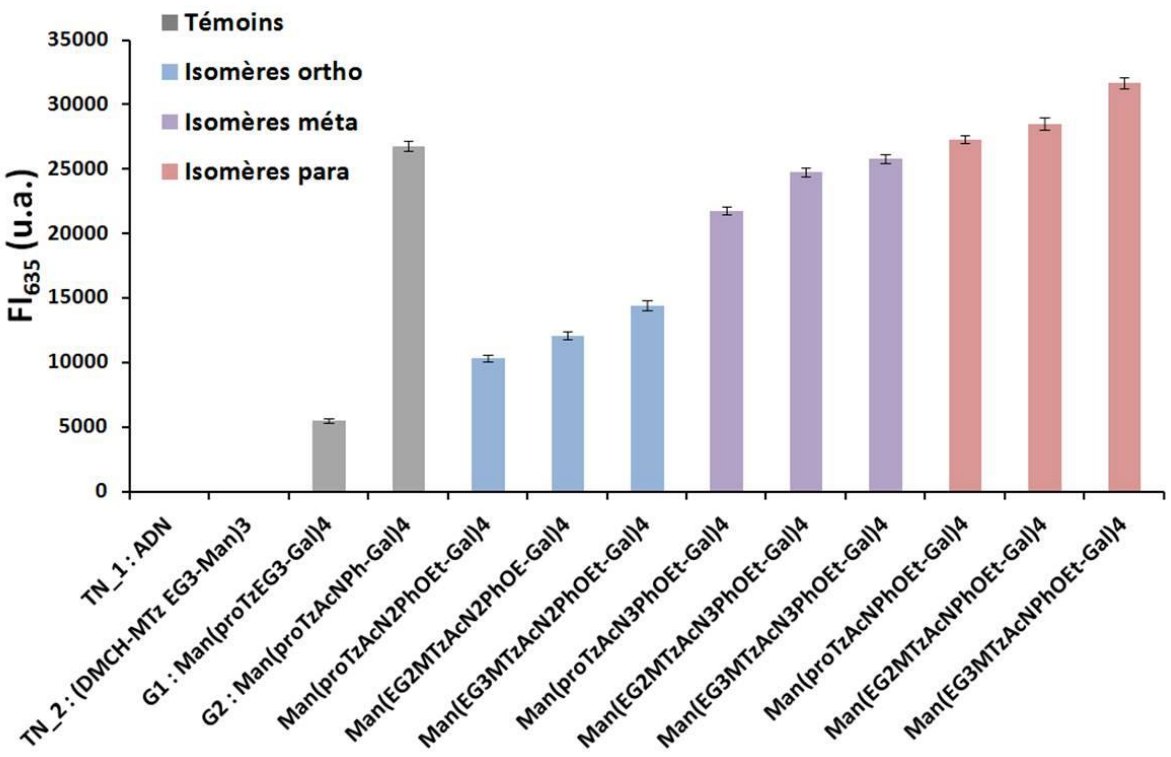


Figure 5-11 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters.

Pour chacun des régioisomères, le linker 1 a un effet peu marqué sur l'interaction avec PA-IL. Néanmoins, un linker 1 long et flexible semble plus favorable qu'un linker 1 plus court et plus rigide (EG_3M > EG_2M > pro). En effet, quel que soit le linker 2, les valeurs de FI_{635} augmentent légèrement lorsqu'on passe d'un linker 1 type pro à EG_2M puis EG_3M. Ces résultats sont confirmés par les mesures de K_d. En effet, les K_d mesurés avec les isomères para, Man(**L1**TzAcN**Ph**OEt-Gal)$_4$, sont de 64 nM pour L1 = pro, 48 nM pour L1 = EG_2M et 39 nM pour L1 = EG_3M.

Ensuite, pour un même linker 1, on s'aperçoit que la FI_{635} augmente fortement lorsque l'on passe de l'isomère ortho à méta puis légèrement du méta à para. Ce résultat est confirmé par des mesures de K_d avec les différents isomères possédant le linker 1 type triéthylène glycol (EG_3M). Les K_d sont respectivement de 304 nM, 52 nM et 39 nM pour l'isomère ortho, méta et para. La modélisation des galactosides présentant chacune des isoméries (AcN^{X}PhOEt-Gal, X=2,3,Ø) a montré des énergies d'interaction avec PA-IL comparables de l'ordre de -65 kcal/mol n'indiquant donc pas de différences d'affinité avec PA-IL pour chacun des isomères. La différence d'affinité entre les trois galactoclusters ne serait pas uniquement due à la régioisomérie. Néanmoins, la régioisomérie semble impacter l'accessibilité des quatre résidus galactoses. Il est donc fort probable que dans le cas de l'isomère ortho, la présentation des différents bras galactosides soit moins favorable à l'interaction avec PA-IL que pour les

isomères méta et para. Une étude comparative, menée par modélisation moléculaire, des différents galactoclusters aromatiques interagissant avec PA-IL grâce à deux de leurs bras a montré que l'isomérie méta est moins favorable que l'isomérie para (cf. 5.1.2.6).

Enfin, les FI_{635} du galactocluster G2 (Man(**pro**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$) et du Man(**pro**TzAcN**PhOEt**-Gal)$_4$ sont respectivement de 26772 u.a et 27287 u.a. et les K_d de 61 nM et 64 nM. Ces deux galactoclusters présentent donc des affinités similaires vis-à-vis de PA-IL ce qui signifie que l'ajout d'un groupement O-Ethyl (OEt) entre le groupement phényle et le galactose n'influence pas l'interaction avec PA-IL.

5.1.2.5. Influence d'un linker présentant un cycle aromatique et une charge électrostatique

Dans un dernier temps, il a été investigué l'impact d'avoir un linker 2 présentant un phényle ainsi qu'une charge électrostatique négative ou positive. Pour ce faire, il a été testé des galactoclusters possédant un linker 2 de type tyrosine avec soit son amine soit son acide carboxylique libre dont les pKa estimés sont respectivement de 8.0 et 3.3. Au pH où sont effectuées les expériences (pH = 7.4), les galactoclusters présentant l'acide carboxylique libre sont donc sous la forme COO^- avec une charge négative disponible. Alors que ceux présentant l'amine libre sont essentiellement sous la forme protonnée, NH_3^+ (80 %) et 20 % sous forme NH_2 (Tableau 5-10).

Id.	Nom	Linker 1	Linker 2	
30	Man(**pro**TzAc**Tyr**-Gal)$_4$	pro	Ac**Tyr**	100 % COO^-
31	Man(**EG$_2$M**TzAc**Tyr**-Gal)$_4$	EG$_2$M	Ac**Tyr**	
32	Man(**EG$_3$M**TzAc**Tyr**-Gal)$_4$	EG$_3$M	Ac**Tyr**	
33	Man(**pro**TzEG$_2$**NTyr**-Gal)$_4$	pro	EG$_2$**NTyr**	80 % NH_3^+ 20 % NH_2
34	Man(**EG$_2$M**TzEG$_2$**NTyr**-Gal)$_4$	EG$_2$M	EG$_2$**NTyr**	
35	Man(**EG$_3$M**TzEG$_2$**NTyr**-Gal)$_4$	EG$_3$M	EG$_2$**NTyr**	

Tableau 5-10 : Galactoclusters étudiés.

Des mesures de FI_{635} ont été effectuées avec ces 6 galactoclusters (Figure 5-12).

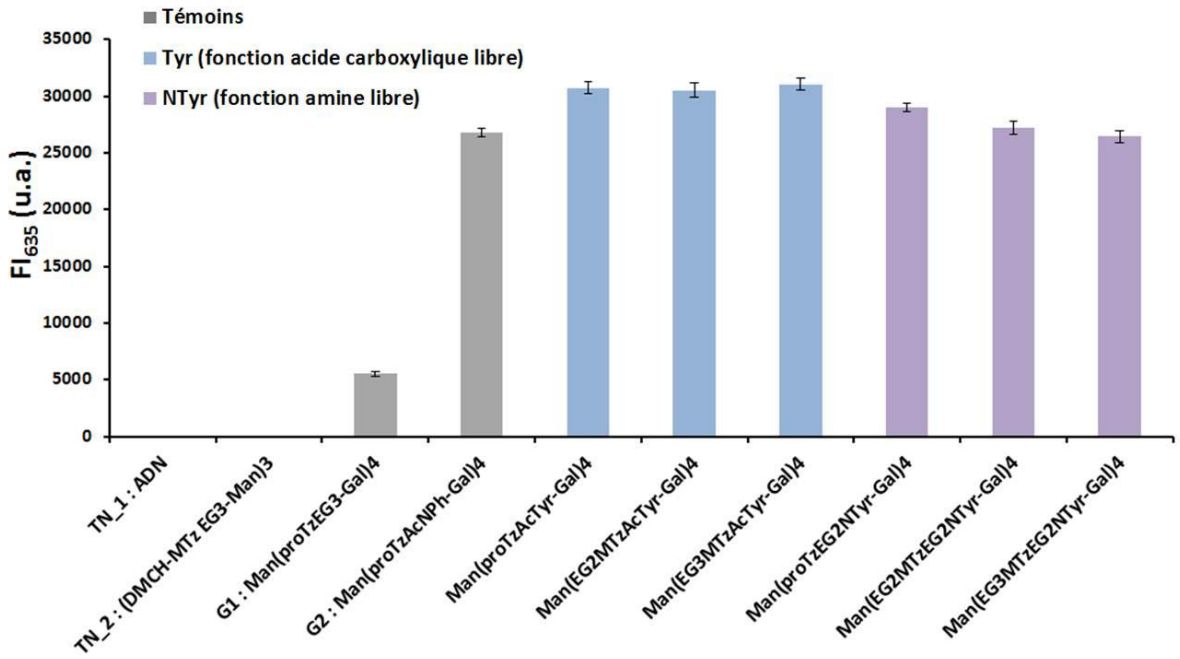


Figure 5-12 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters.

A nouveau, l'influence du linker 1 n'est pas très marquée et les 6 galactoclusters présentent une forte affinité pour PA-IL. En effet, d'un linker 1 à l'autre, les FI_{635} de ces 6 galactoclusters ne varient quasiment pas et sont légèrement supérieures à celle du galactocluster G2.

Si l'on s'intéresse à l'effet du linker 2, il apparait que tous les galactoclusters possédant une fonction acide carboxylique de libre (Man(**L1**TzAc**Tyr**-Gal)$_4$) possèdent une FI_{635} légèrement supérieure à celles observées pour les galactoclusters possédant une fonction amine de libre (Man(**L1**TzEG$_2$**NTyr**-Gal)$_4$). Il semblerait que la présence d'une charge négative sur le COO^- soit plus favorable pour l'interaction avec PA-IL. De plus, le Man(**EG$_3$M**TzEG$_2$**NTyr**-Gal)$_4$ possède un K_d de 47 nM comparé à 19 nM pour le Man(**EG$_3$M**TzAc**Tyr**-Gal)$_4$ (COO^-). Ces valeurs de K_d montrent que ces deux galactoclusters possèdent une plus forte affinité pour PA-IL que le galactocluster G2 (K_d de 61 nM). De plus, elles confirment qu'un galactocluster possédant une tyrosine avec une fonction COO^- de libre est plus favorable pour interagir avec PA-IL qu'un galactocluster possédant une fonction amine de libre. Enfin, ce galactocluster, Man(**EG$_3$M**TzAc**Tyr**-Gal)$_4$, a une affinité équivalente aux trois meilleurs des galactoclusters aromatiques présentés dans le paragraphe 5.1.2.3.

Néanmoins, Reymond *et al.* ont reporté la structure cristalline d'un galactoside avec un cycle aromatique et une lysine (GalAG0, pdb : 3ZYB) interagissant avec PA-IL (Kadam et al., 2011). Trois conformations ont été décrites, toutes permettent la stabilisation du galactoside dans la poche de reconnaissance du galactose de PA-IL grâce à du π-stacking entre le cycle

aromatique et le résidu His50 de PA-IL. Une des conformations permet aussi de mettre en évidence une interaction ionique entre l'amine (NH_3^+) de la lysine et l'acide carboxylique (COO^-) du résidu Asp47 de PA-IL. Dans notre cas, les galactoclusters présentant une amine libre (Man(**L1**TzEG_2**NTyr**-Gal)$_4$) n'améliore pas l'interaction avec PA-IL. Il ne semble donc pas y avoir d'interaction ionique entre l'amine de la tyrosine et l'acide carboxylique de l'Asp47. Il peut être fait plusieurs hypothèses :

- L'amine de la tyrosine n'est pas assez éloignée de la chaine latérale du bras des galactoclusters et donc non accessible à l'acide carboxylique de l'Asp47.
- L'amine n'est que partiellement protonée au pH où sont réalisées les expériences et est donc aussi retrouvée sous la forme NH_2 ne permettant pas d'interaction ionique.

Une étude par modélisation moléculaire des galactosides chargés avec leur analogue neutre a été menée (Tableau 5-11).

Nom	ΔE (kcal/mol)
AcTyr-Gal(COO^-)	-73.7
AcTyr-Gal(COOH)	-64.1
EG_2NTyr-Gal(NH_3^+)	-78.0
EG_2NTyr-Gal(NH_2)	-67.4

Tableau 5-11 : Energies potentielles d'interaction des différents galactosides avec PA-IL.

Dans les deux cas, l'apport d'une charge favorise l'interaction avec PA-IL d'environ 10 kcal/mol ce qui bien inférieure à une force d'interaction ionique (100 kcal/mol). Il semblerait donc que ces aglycones ne permettent pas de réaliser une interaction ionique. Dans le cas du galactoside avec la tyrosine possédant son amine libre protonée (EG_2NTyr-Gal(NH_3^+)), il n'est pas observé d'interaction ionique avec le COO^- de l'Asp47. La distance entre le NH_3^+ du galactoside et le COO^- de l'Asp47 est d'environ 8.2 Å ce qui est supérieure à la distance permettant une interaction ionique dans les conditions du docking. Dans le cas du galactoside présentant une fonction acide carboxylique déprotonée (AcTyr-Gal(COO^-)), une liaison hydrogène supplémentaire est créée avec l'His50 par rapport à la forme COOH correspondant au gain d'énergie d'interaction de 10 kcal/mol (Figure 5-13).

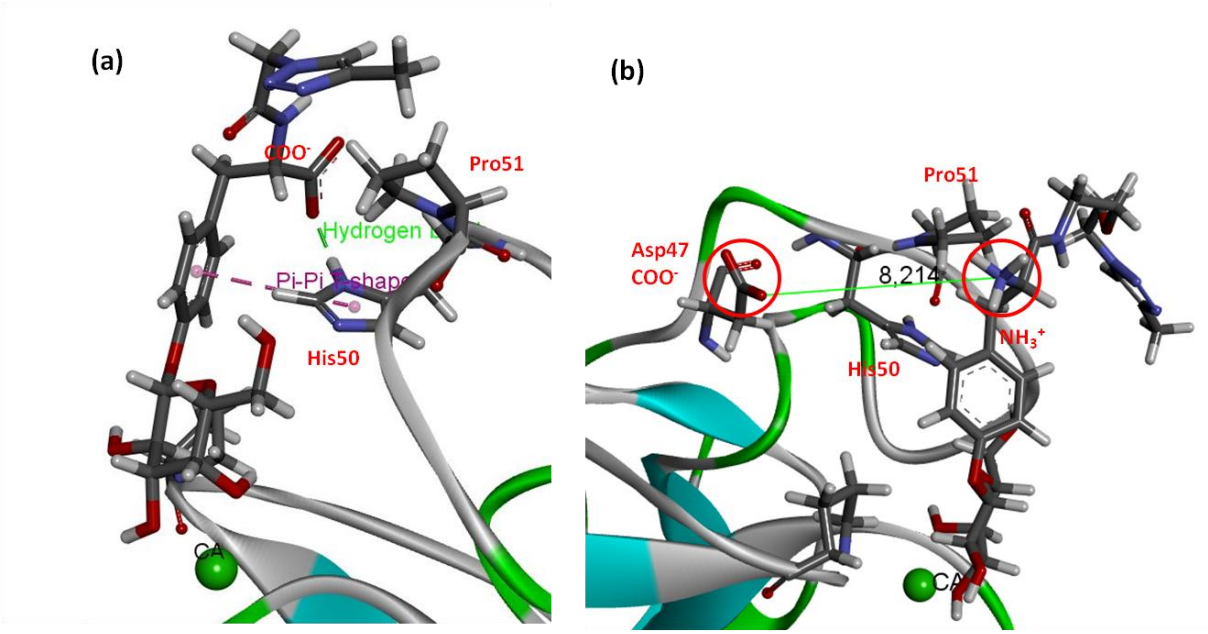


*Figure 5-13 : Modélisation moléculaire de l'interaction des galactosides AcTyr-Gal(**COO⁻**) (a) et EG_2NTyr-Gal(**NH_3^+**) (b) avec PA-IL.*

5.1.2.6. Modélisation moléculaire de l'interaction multivalente galactocluster/PA-IL

Les modélisations présentées ci-dessus concernent l'interaction de galactosides avec PA-IL. Il s'agit d'interactions monovalentes entre un galactoside et un monomère de PA-IL. Afin de se rendre compte de l'influence de la présentation multivalente des galactosides grâce au glycoclusters sur l'interaction avec PA-IL et de quelles branches du glycocluster sont impliquées dans l'interaction, une étude de modélisation moléculaire avec huit galactoclusters a été menée.

Pour cela, il a été choisi de modéliser l'interaction de deux bras du galactocluster tétravalent avec deux sites présents sur le bord court d'une même lectine PA-IL. En effet, une analyse par ITC du galactocluster G2 : Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$ a montré qu'il possédait un K_d de 194 nM avec une stœchiométrie de 0.46 signifiant qu'un galactocluster interagit avec deux sites de PA-IL. Il n'a pas été observé d'agrégations laissant penser qu'il s'agit de l'interaction de deux galactosides d'un galactocluster avec deux sites d'un même tétramère de PA-IL et non du pontage de deux tétramères par un galactocluster (Ligeour et al., 2015b). De plus, par ITC, la mesure du K_d du galactoside Ph-OGal est de 8.8 µM, le galactocluster G2 possède donc une efficacité d'interaction avec PA-IL 45 fois plus grande que le galactoside ce qui correspond à une efficacité relative par galactose de 11.3 (Kadam et al., 2013b). Il semblerait donc bien qu'il s'agisse d'une interaction chélate entre deux galactosides d'un même galactocluster et

deux sites d'un tétramère de PA-IL. Ainsi, les galactoclusters possédant 4 bras, il y a six combinaisons aléatoires possibles d'interaction avec PA-IL : bras 2 et 3, bras 2 et 4, bras 2 et 6, bras 3 et 4, bras 3 et 6 et bras 4 et 6 (Figure 5-14).

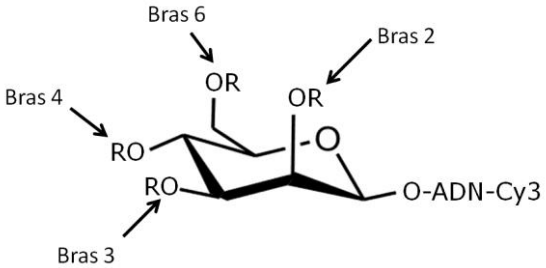


Figure 5-14 : Représentation du cœur mannose avec la position sur laquelle les bras galactosides sont greffés.

Les galactoclusters étudiés ici présentent un linker 1 EG_2M et différents linkers 2 aromatiques comme celui présentant l'hétérocycle pyridine, les isomères ortho et para de l'*O*-éthyl-*N*-phénylacétamide, le bicycle napthyle ainsi que ceux présentant une tyrosine avec sa fonction acide carboxylique ou amine de libre. Le tableau 5-12 présente les énergies d'interaction des 6 configurations possibles d'interaction pour chaque galactocluster.

		Energie potentielle d'interaction (ΔE), kcal/mol					
Id.	**Nom**	**bras 2 et 3**	**bras 2 et 4**	**bras 2 et 6**	**bras 3 et 4**	**bras 3 et 6**	**bras 4 et 6**
11	Man(EG_2MTzEG_2NOC^{3}PyrM-Gal)$_4$	-210,7	**-191,3**	**-186,7**	**-177,3**	**-186,4**	-229,1
22	Man(EG_2MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	**-186,3**	**-168,2**	-260,2	**-176,2**	-290,9	-201,9
28	Man(EG_2MTzACNPhOEt-Gal)$_4$	-256,3	**-212,3**	**-219,1**	-197,4	-203,9	-205,9
15	Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$	**-227,7**	**-204,5**	-243,1	-258,0	-234,6	**-227,6**
17	Man(EG_2MTzProNOCNapht-Gal)$_4$	**-223,4**	**-225,0**	-199,3	-156,3	-203,8	-175,7
31	Man(EG_2MTzAcTyr(COO^-)-Gal)$_4$	-195,5	-211,8	**-247,2**	**-269,7**	**-268,1**	-186,0
34	Man(EG_2MTzEG_2NTyr(NH_3^+)-Gal)$_4$	**-348,6**	-397,7	-398,9	-502,4	-529,2	-479,9
34	Man(EG_2MTzEG_2NTyr(NH_2)-Gal)$_4$	-256,9	**-219,6**	**-203,2**	**-219,3**	**-216,3**	-228,6

Tableau 5-12 : Energies potentielles d'interaction de différents galactoclusters dont deux bras interagissent avec un tétramère de PA-IL.

Il peut être remarqué que pour un même galactocluster, la modélisation de son interaction avec PA-IL varie en fonction des bras utilisés. Grâce aux résultats d'affinité obtenus sur le microarray, il peut être déduit quels sont les bras qui interagissent préférentiellement avec

PA-IL pour chacun de galactoclusters. Par exemple, pour le galactocluster Man(EG_2MTzEG_2NOC^{3}PyrM-Gal)$_4$, il s'agit de la combinaison de bras 2/6, 3/4 ou 3/6.

A l'exception du Man(EG_2MTzEG_2NTyr(NH_3^+)-Gal)$_4$, le classement des différents galactoclusters pour leur interaction avec PA-IL concordent avec les résultats obtenus sur microarray. En effet, les galactoclusters Man(EG_2MTzEG_2NOC^{3}PyrM-Gal)$_4$ et Man(EG_2MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$ font partis des galactoclusters aromatiques possédant le moins d'affinité pour PA-IL d'après les résultats obtenus sur le microarray et sont aussi ceux que la modélisation montrent comme ayant des énergies potentielles d'interaction avec PA-IL les plus élevées. De plus, nous venons de voir que la régioisomérie du cycle aromatique influence l'interaction avec PA-IL, l'isomère ortho (Man(L1MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$) présentant moins d'affinité pour PA-IL que l'isomère para (Man(L1MTzAcNPhOEt-Gal)$_4$). Les résultats de modélisation des galactoclusters interagissant avec leurs bras 2 et 4 avec PA-IL montrent une différence d'énergie potentielle d'interaction d'environ 50 kcal/mol en faveur de l'isomère para. La topologie engendrée par le galactocluster possédant l'isomère para est donc plus favorable pour interagir avec PA-IL. Des énergies d'interaction similaires à celle de ce galactocluster ont été obtenues pour les galactoclusters Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$ et Man(EG_2MTzProNOCNapht-Gal)$_4$. Les résultats expérimentaux avaient montré une préférence pour Man(EG_2MTzProNOCNapht-Gal)$_4$ avec une affinité similaire au Man(EG_2MTzAcTyr(COO^-)-Gal)$_4$. La modélisation de ce dernier montre bien une augmentation d'affinité d'environ 40 kcal/mol. La modélisation moléculaire de ce galactocluster interagissant grâce aux bras 3 et 4 (ΔE = -269,7 kcal/mol) avec deux sites d'un tétramère de PA-IL est représentée en figure 5-15. Chacun des deux galactoses font des liaisons de coordination avec le Ca^{2+} via leurs hydroxyles O3 et O4 ainsi que des liaisons hydrogènes avec l'Asn107 via O2/O3 et l'His50 via O6. Ces interactions sont également retrouvées dans le co-crystal de Gal/PA-IL (réf. PDB : 1OKO). Le bras 4 du galactocluster interagit avec le monomère A de PA-IL (à gauche sur la figure 5-15) et le bras 3 avec le monomère B (à droite sur la figure 5-15). Le carboxylate (COO^-) du bras 4 s'oriente vers l'extérieur alors que celui du bras 3 est engagé dans une liaison hydrogène avec l'Asn107 permettant la stabilisation du complexe galactocluster/PA-IL.

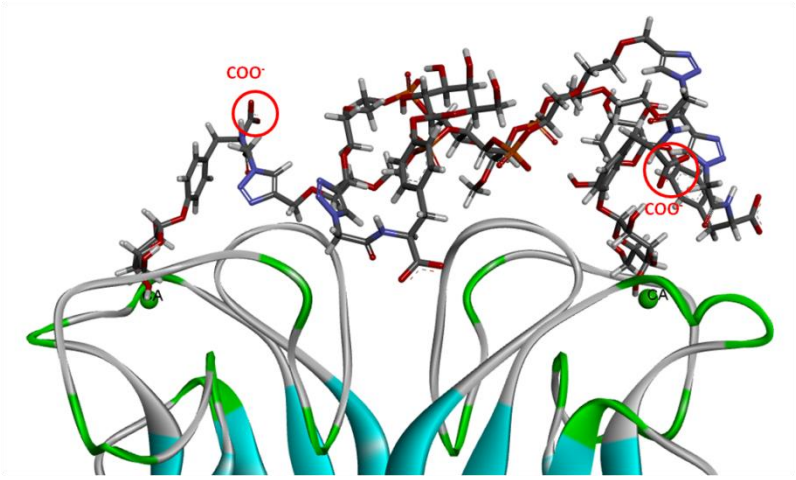


Figure 5-15 : Modélisation moléculaire de l'interaction du galactocluster Man(EG$_2$MTzAcTyr(COO$^-$)-Gal)$_4$ avec PA-IL.

Enfin, les résultats de modélisation montrent une nette préférence du Man(EG$_2$MTzEG$_2$NTyr(NH$_3^+$)-Gal)$_4$ avec un gain d'affinité de plus de 100 kcal/mol correspondant au niveau d'énergie d'une liaison ionique. Néanmoins, expérimentalement, il n'est pas retrouvé ce gain d'affinité. En solution et à pH 7.4, les amines du Man(EG$_2$MTzEG$_2$NTyr(NH$_3^+$)-Gal)$_4$ ne sont que partiellement protonnée (80%), ce qui pourrait expliquer ce désaccord. En revanche, les résultats de modélisation du galactocluster Man(EG$_2$MTzEG$_2$NTyr(NH$_2$)-Gal)$_4$ sont en accord avec les résultats expérimentaux obtenus sur le microarray.

5.1.3. Etude des interactions de galactoclusters contenant des atomes de soufre

5.1.3.1. Galactoclusters étudiés

16 galactoclusters modifiés avec au moins un atome de soufre ont été étudiés. Il s'agit soit de galactoclusters possédant un atome de soufre près du cœur dans le cas de la liaison phosphorothioate soit de *S*-galactoside (Figure 5-16). Ces deux types de liaison phosphorothiate et thio-galactoside sont connues pour être, respectivement, résistantes aux phosphodiestérases et glycosidases (Kadam et al., 2013b; Rodrigue et al., 2013; Spitzer and Eckstein, 1988). En vue d'un développement de médicament avec les galactoclusters, ces propriétés permettraient d'augmenter le temps de demi-vie dans l'organisme du galactocluster avant qu'il ne soit métabolisé/éliminé. Enfin, les galactoclusters étudiés présentent tous un linker 1 flexible (EG$_2$M ou EG$_3$M) et un linker 2 aromatique type benzyle, phényle, biphényle ou naphtyle.

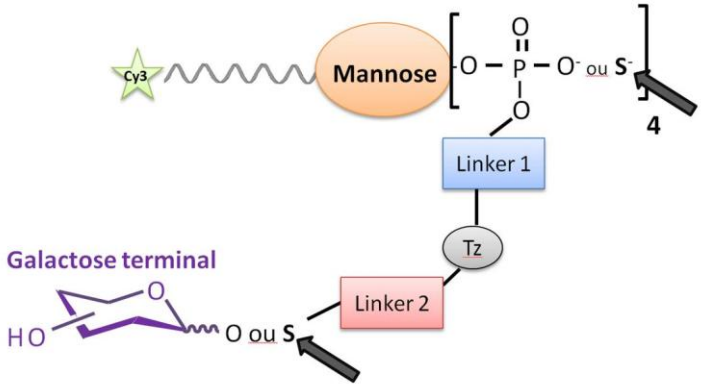


Figure 5-16 : Représentation schématique des galactoclusters possédant un ou deux hétéroatomes de soufre.

5.1.3.2. Influence de la liaison phosphorothiate

Ces galactoclusters ne variant que d'un atome et présentant une assez forte affinité pour PA-IL, leur interaction avec PA-IL a été évaluée par des mesures d'IC_{50} et de K_d sur le microarray (Tableau 5-13).

Id.	Nom	PS	Linker 1	Linker 2	IC_{50} (mM)	K_d (nM)
13	Man(EG_2MTzAcNBn-Gal)$_4$	/	EG_2M	AcN**Bn**	**8,1**	**99**
36	Man(**PS**-EG_2MTzAcNBn-Gal)$_4$	PS	EG_2M	AcN**Bn**	**5,7**	**170**
14	Man(EG_3MTzAcNBn-Gal)$_4$	/	EG_3M	AcN**Bn**	**9,1**	**85**
37	Man(**PS**-EG_3MTzAcNBn-Gal)$_4$	PS	EG_3M	AcN**Bn**	**8,4**	**125**
15	Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$	/	EG_2M	AcN**Ph**	**91,6**	**36**
38	Man(**PS**-EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$	PS	EG_2M	AcN**Ph**	**36,7**	**63**
16	Man(EG_3MTzAcNPh-Gal)$_4$	/	EG_3M	AcN**Ph**	**122,7**	**28**
39	Man(**PS**-EG_3MTzAcNPh-Gal)$_4$	PS	EG_3M	AcN**Ph**	**17,7**	**76**
19	Man(EG_2MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	/	EG_2M	proNOC**BiPh**	**160,3**	**20**
40	Man(**PS**-**EG_2M**TzproNOCBiPh-Gal)$_4$	PS	EG_2M	proNOC**BiPh**	**103,1**	**39**
20	Man(**EG_3M**TzproNOCBiPh-Gal)$_4$	/	EG_3M	proNOC**BiPh**	**68,9**	**46**
41	Man(**PS**-**EG_3M**TzproNOCBiPh-Gal)$_4$	PS	EG_3M	proNOC**BiPh**	**81,6**	**43**
17	Man(EG_2MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	/	EG_2M	proNOC**Napht**	**178,3**	**14**
42	Man(**PS**-EG_2MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	PS	EG_2M	proNOC**Napht**	**160,2**	**20**
18	Man(EG_3MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	/	EG_3M	proNOC**Napht**	**68**	**48**
43	Man(**PS**-EG_3MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	PS	EG_3M	proNOC**Napht**	**129,4**	**31**

Tableau 5-13 : Galactoclusters étudiés avec leurs valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues sur le microarray.

Si l'on s'intéresse dans un premier temps aux galactoclusters Man(**L1**TzAcN**Bn**-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$ ne variant que par la liaison phosphodiester ou phosphorothioate (**PS**), la liaison phosphorothiate est défavorable à l'interaction avec PA-IL. En effet, les galactoclusters présentant une liaison phosphorothioate présentent tous un IC_{50} plus faible et un K_d plus élevé que leur analogue possédant une liaison phosphodiester. De manière générale, les valeurs de K_d sont 1.5 à 2 fois plus élevées entre un galactocluster possédant une liaison phosphorothioate et son analogue possédant une liaison phosphodiester. Par exemple, le galactocluster Man(**EG$_2$M**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$ a un K_d de 36 nM (liaison phosphodiester) et seulement de 63 nM pour son analogue avec une liaison phosphorothioate (Man(**PS-EG$_2$M**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$).

En revanche pour les galactoclusters Man(**L1**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzproNOC**Napht**-Gal)$_4$, l'effet de la liaison phosphorothioate est moins marqué. En effet, si l'on compare les valeurs de K_d deux à deux (même L1 et L2), celles-ci ne varient que de moins de 7 nM à l'exception des galactoclusters Man(**EG$_2$M**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$ et Man(**PS-EG$_2$M**TzproNOC**BiPh**-Gal)$_4$. L'incorporation d'une liaison phosphorothioate à de tels galactoclusters en vue du développement d'un médicament ciblant PA-IL, pourrait donc éviter leur hydrolyse par les phosphodiestérases et augmenter leur temps de demi-vie sans pour autant affecter leur affinité vis-à-vis de PA-IL.

5.1.3.3. Influence de la liaison thio-galactoside

L'influence d'une liaison thio-galactoside a également été étudiée dans le cas de galactoclusters possédant un linker 2 benzyle et phényle grâce à des mesures d'IC_{50} et de K_d (Tableau 5-14).

Id.	Nom	Linker 1	Linker 2	SGal	IC_{50} (mM)	K_d (nM)
13	Man(EG$_2$MTzAcNBn-Gal)$_4$	EG$_2$M	AcN**Bn**	/	**8,1**	**99**
44	Man(EG$_2$MTzAcNBn-SGal)$_4$	EG$_2$M	AcN**Bn**	S	**12**	**85**
14	Man(EG$_3$MTzAcNBn-Gal)$_4$	EG$_3$M	AcN**Bn**	/	**9,1**	**85**
45	Man(EG$_3$MTzAcNBn-SGal)$_4$	EG$_3$M	AcN**Bn**	S	**13,3**	**76**
15	Man(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_4$	EG$_2$M	AcN**Ph**	/	**91,6**	**36**
46	Man(EG$_2$MTzAcNPh-SGal)$_4$	EG$_2$M	AcN**Ph**	S	**45,1**	**51**
16	Man(EG$_3$MTzAcNPh-Gal)$_4$	EG$_3$M	AcN**Ph**	/	**122,7**	**28**
47	Man(EG$_3$MTzAcNPh-SGal)$_4$	EG$_3$M	AcN**Ph**	S	**63,9**	**49**

Tableau 5-14 : Galactoclusters étudiés avec leurs valeurs d'IC_{50} et de K_d obtenues sur le microarray.

Si l'on s'intéresse aux galactoclusters Man(**L1**TzAcN**Bn**-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzAcN**Bn**-**S**Gal)$_4$, le thio galactoside *S*-Gal est légèrement plus favorable qu'une liaison *O*-Gal à l'interaction avec PA-IL. En revanche, pour les galactoclusters Man(**L1**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$ et Man(**L1**TzAcN**Ph**-**S**Gal)$_4$, une liaison *S*-galactoside est moins favorable qu'une liaison *O*-Gal pour interagir avec PA-IL.

Une étude menée par l'équipe de Reymond et réalisée avec les galactosides Ph-*O*-Gal et Ph-*S*-Gal confirment aussi ce résultat. Les K_d mesurés par ITC étaient respectivement de 8.8 et 9.9 µM vis-à-vis de PA-IL. Néanmoins, les différences d'affinités mesurées sont faibles. L'utilisation de *S*-galactoside pourrait donc être envisagée dans le cas d'un développement de médicaments ciblant PA-IL afin d'éviter leur hydrolyse par des galactosidases.

Des tendances similaires d'affinité pour PA-IL ont été obtenues avec des galactoclusters doublement modifiés avec un atome de soufre (liaisons phosphotothioate et *S*-galactoside), ce qui laisse également envisager l'utilisation de telles liaisons dans le cas du développement de médicaments (cf. Annexe F1, Id. 48 à 51). Enfin, des galactoclusters présentant un atome de souffre entre le linker 1 et le linker 2 à la place d'un triazole (Tz) ont aussi été étudiés sur microarray pour leur affinité vis-à-vis de PA-IL (Man(L1**S**L2-Gal)$_4$). Dans ce cas, ce type de modification affecte l'interaction avec PA-IL par rapport à ceux présentant un triazole, les résultats sont aussi présentés en annexe F1 (Id. 52 à 63).

5.1.4. Discussion - conclusion

Pour conclure, il a été présenté l'étude d'affinité sur microarray de 72 glycoclusters ciblant PA-IL. Pour cela, nous avons principalement présentés l'effet du motif saccharidique, du linker 2 aromatique et de l'apport d'hétéroatomes de soufre sur l'interaction avec PA-IL.

L'étude de l'impact de différents motifs saccharidiques a montré le fort potentiel des disaccharides Galα1-3Gal et Galα1-4Gal pour interagir avec PA-IL :

Core type2, LNnT, 6GrB ≤ 4GrB < Gal < Galα1-3Gal < Galα1-4Gal

Ce classement est conforté par les résultats présentés dans le chapitre 4 et la littérature (Imberty et al., 2004; Nurisso et al., 2010). Dans le chapitre 3, il avait été mentionné l'impact positif d'un aglycone aromatique sur l'interaction avec PA-IL à travers la caractérisation des galactoclusters aliphatique G1 : Man(proTzEG$_3$-Gal)$_4$ et aromatique G2 : Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$. La littérature ainsi qu'une étude par modélisation moléculaire ont montré que l'introduction d'un aglycone aromatique dans le cas de glycoclusters présentant les disaccharides Galα1-3/4Gal n'apportait pas un fort gain d'interaction avec PA-IL à l'instar

des galactoclusters. C'est pourquoi, l'impact de différents linker 2 aromatiques a été investigué avec des galactoclusters tétravalents possédant un cœur mannose et un linker 1 aliphatique plus ou moins long et flexible (pro, EG_2M ou EG_3M).

L'étude a montré que l'influence du linker 1 était minime avec une tendance à l'amélioration de l'interaction avec un linker long et flexible type EG_2M ou EG_3M par rapport à linker de type propyle (A l'exception des galactoclusters à linker 2 type naphtyle et biphényle). Bien qu'un coût entropique puisse être attribué à l'augmentation de la flexibilité du glycocluster, celui-ci peut plus facilement s'adapter à la structure du site de reconnaissance de PA-IL et donc interagir avec ce dernier. Pour ce qui est des linkers 2 aromatiques, il a été remarqué que les cycles possédant une plus forte aromaticité et donc densité en électrons π permettaient d'augmenter l'interaction avec PA-IL. C'est notamment ce qui a pu être remarqué en comparant les galactoclusters possédant l'hétérocycle thiophène par rapport à furane. De plus, la comparaison de galactoclusters possédant les galactosides Ph-O-Gal et Bn-O-Gal a aussi montré une nette préférence pour le phényle par rapport au benzyle. Dans le cas du Ph-O-Gal, l'un des doublets non liant de l'oxygène pouvait rentrer en résonance avec le cycle aromatique et ainsi enrichir ce dernier en électrons π. Cette interaction est d'autant plus renforcée avec les galactoclusters possédant les galactosides bicycliques BiPh-O-Gal et Napht-O-Gal. L'étude par modélisation moléculaire de ces différents galactosides aromatiques a montré que tous les cycles pouvaient rentrer en interaction avec les résidus His50, Pro51 ou Pro38 de PA-IL grâce à des interactions de type π-stacking en adoptant la conformation T-shaped, à l'exception du biphényle qui adopte la conformation offset. La co-cristallisation du complexe Ph-O-Gal avec PA-IL avait aussi montré que le phényle engendrait ce type d'interaction (T-shaped) avec l'His50 de PA-IL où le cycle imidazole de l'His50 se trouvait dans le plan de l'interaction et le cycle phényle perpendiculaire au plan (Kadam et al., 2013b). Dans cette conformation T-shaped, plus le cycle dans le plan est électrophile et plus le cycle perpendiculaire au plan possède une forte densité électronique, plus l'interaction est favorisée (Carver et al., 2001). Ces résultats convergent donc bien vers le fait que plus le cycle aromatique porté par le linker 2 du galactocluster est riche en électrons π, plus l'interaction avec les résidus His50, Pro51 ou Pro38 de PA-IL est forte et donc plus l'interaction du galactocluster avec PA-IL est stabilisée.

L'étude de l'effet de l'isomérie du linker 2 *O*-éthyl-*N*-phénylacétamide sur l'interaction avec PA-IL a aussi montré que l'isomère ortho affectait négativement l'interaction avec PA-IL comparé aux isomères méta et para. De plus, l'apport d'une charge positive ou négative grâce à l'utilisation d'un linker 2 possédant une tyrosine avec respectivement son amine ou son

acide carboxylique de libre a été exploré. Il n'a pas été obtenu un fort gain d'affinité pouvant être attribué à la création d'une interaction ionique entre ces galactoclusters et les résidus chargés de PA-IL. Néanmoins, dans le cas de l'utilisation des galactoclusters, Man(L1MTzAcTyr(COO^-)-Gal)$_4$, un gain d'affinité a été obtenu par rapport aux galactoclusters non chargés pouvant être attribué à la création d'une liaison hydrogène avec l'Asn107 ou l'His50 (cf. modélisation du galactocluster Man(L1MTzAcTyr(COO^-)-Gal)$_4$, § 5.1.2.6 et du galactoside AcTyr-Gal(COO^-) § 5.1.2.5).

Les galactoclusters possédant un linker 2 avec un cycle aromatique type phényle, biphényle et naphtyle ainsi qu'une tyrosine avec l'acide carboxylique de libre déprotonné possèdent une forte affinité pour PA-IL, de l'ordre du nM. Cependant aucun n'ont permis de passer du nM au pM et une limite semble être atteinte avec des différences d'affinités parfois difficile à mettre en évidence.

Il serait donc intéressant de travailler d'une part sur la topologie du galactocluster pour espérer augmenter l'effet chélate et permettre l'interaction simultanée avec les quatre sites présents sur un tétramère de PA-IL. De plus, il serait intéressant de tester des galactoclusters possédant des bras supplémentaires sans galactose mais pouvant faire des connexions avec des résidus présents sur PA-IL proches du site de reconnaissance afin de renforcer l'interaction.

Enfin, il a été montré que l'apport d'hétéroatomes de soufre à travers une liaison phosphorothioate et/ou *S*-galactoside déstabilisait que très légèrement l'interaction avec PA-IL. Ces liaisons sont résistantes à l'action des phosphodiestérases et glycosidases. Elles pourraient donc permettre de ralentir le métabolisme des galactoclusters et donc d'augmenter leur temps de demi-vie en vue de leur utilisation comme médicaments

5.2. Etude d'affinité des glycoclusters ciblant PA-IIL

Comme expliqué dans le chapitre 1, PA-IIL est une lectine soluble de *Pseudomonas aeruginosa* qui reconnait le fucose en présence de deux atomes de Ca^{2+} et également le mannose dans une moindre mesure. C'est aussi un facteur de virulence dont la fonction précise n'est pas totalement connue. PA-IIL serait impliquée dans la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et serait capable d'inhiber les mouvements ciliaires au niveau des poumons. La structure de cette lectine est connue et forme un tétramère dont chaque monomère possède un site de reconnaissance pour le fucose. Ce tétramère peut être assimilé à

un parallélépipède où deux sites de liaison du fucose sont présents sur chacune de ses faces aux extrémités opposés (Figure 5-17).

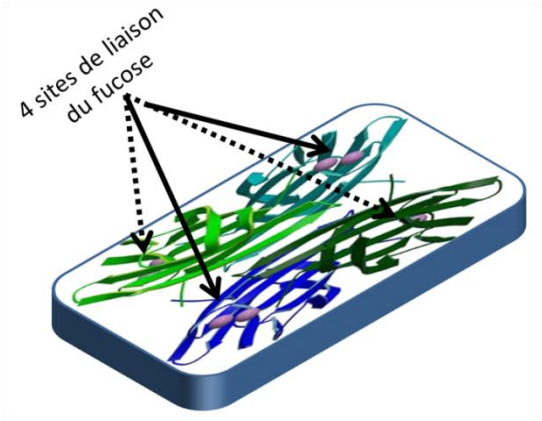


Figure 5-17 : Représentation schématique de PA-IIL.

L'étude d'affinité, menée grâce au microarray développé au laboratoire, de différentes structures de glycoclusters ciblant les sites de fixation du fucose de cette lectine va être présentée dans ce paragraphe. Plus précisément, nous allons, nous intéresser, aux glycoclusters fonctionnalisés avec des motifs saccharidiques issus du criblage de la bibliothèque de sucres présentés au chapitre 4. Le tableau 5-15 rappelle la structure des cinq sucres qui ont été sélectionnés à la suite de ce criblage ainsi que la note qu'ils avaient obtenus.

Nom raccourci	Structure	Note
sLewis^X	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C
Lewis^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C
Lewis^B	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	C
3FL	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B
Lewis^A	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	A

Tableau 5-15 : Liste des oligosaccharides sélectionnés à la suite du criblage vis-à-vis de PA-IIL

A l'exception du sLewis^X, pour chaque motif saccharidique, 12 glycoclusters ainsi que leur équivalent monovalent ont été synthétisés par nos collègues de l'IBMM. Ils comportent 6 cœurs permettant 6 topologies différentes et deux linkers 1 flexibles plus ou moins long. Pour le sLewis^X, deux glycoclusters et l'équivalent monovalent ont été synthétisés. Au total, 50 glycoclusters ont été synthétisés ainsi que 5 molécules équivalentes monovalentes.

5.2.1. Etude des interactions de PA-IIL avec des glycoclusters possédant différents motifs saccharidiques et valences

5.2.1.1. Glycoclusters étudiés

Les glycoclusters présentés ici varient en fonction de la nature et du nombre de motifs saccharidiques présentés. Ils présentent un linker 1 long et flexible type tétraéthylène glycol (EG_4) et leur valence est de 3 (cœur ribose) ou 4 (cœur mannose). Leur équivalent monovalent (cœur THME) possède un linker 1 long type hexyle. Les combinaisons des cœurs et linkers sont présentées figure 5-3.

L'affinité de ces 15 molécules (Tableau 5-16) a été étudiée sur le microarray en les mettant en présence de la lectine PA-IIL marquée à l'Alexa647.

Id.	Nom	Cœur	Linker 1	Linker 2	Sucre	n
173	THME-HexTzMNAc-sLewis^X	THME	Hex	MNAc	sLewis^X	1
123	Ribo(EG$_4$TzMNAc-sLewis^X)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	sLewis^X	3
152	Man(EG$_4$TzMNAc-sLewis^X)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	sLewis^X	4
169	THME-HexTzMNAc-Lewis^X	THME	Hex	MNAc	Lewis^X	1
116	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	3
145	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Lewis^X	4
170	THME-HexTzMNAc-Lewis^B	THME	Hex	MNAc	Lewis^B	1
118	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	3
147	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Lewis^B	4
171	THME-HexTzMNAc-3FL	THME	Hex	MNAc	3FL	1
120	Ribo(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	3FL	3
149	Man(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	3FL	4
172	THME-HexTzMNAc-Lewis^A	THME	Hex	MNAc	Lewis^A	1
122	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ribo	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	3
151	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Man	EG$_4$	MNAc	Lewis^A	4

Tableau 5-16 : Glycoclusters et molécules monovalentes étudiés.

5.2.1.2. Influence du motif saccharidique

La figure 5-18 représente la moyenne des intensités de fluorescence à 635 nm (FI_{635}) émises par l'Alexa647_PA-IIL interagissant avec les différents glycoclusters et leur analogue monovalent immobilisés par DDI sur le microarray.

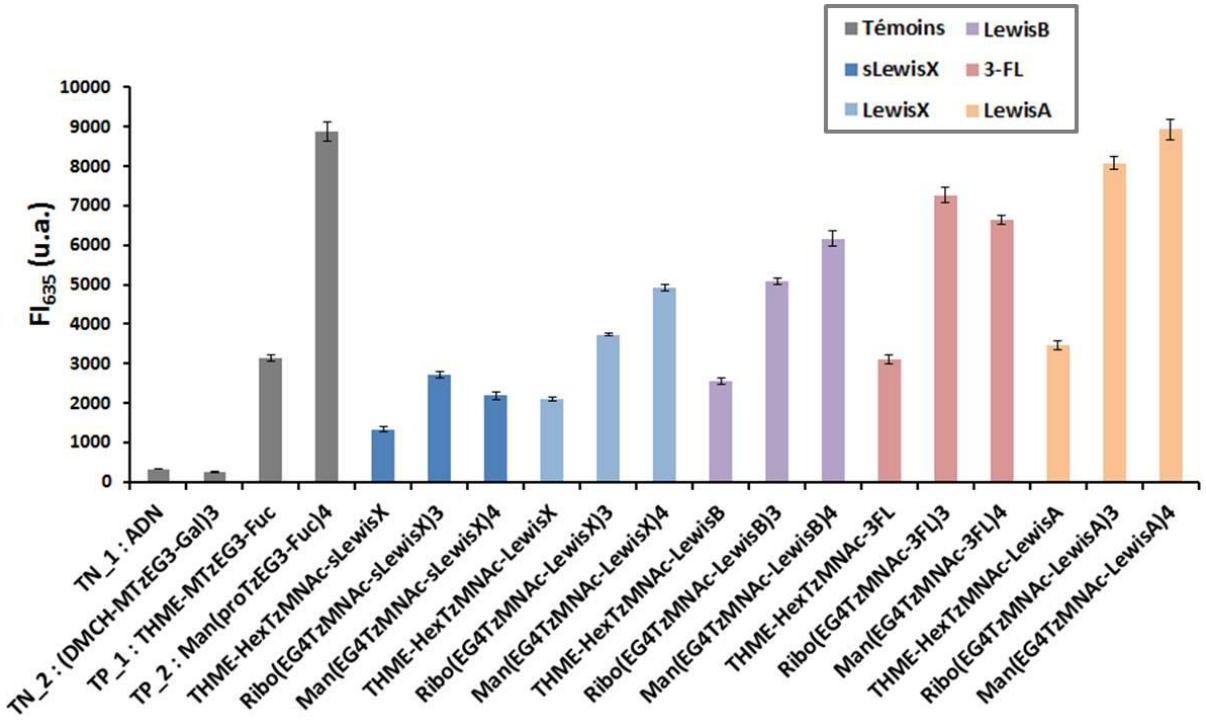


Figure 5-18 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les molécules monovalentes et les glycoclusters étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Tout comme l'étude d'affinité avec PA-IL, plusieurs témoins sont présents sur le microarray afin de valider l'expérience. Les témoins négatifs correspondent à des conditions dans lesquelles pas ou très peu de FI_{635} est attendue. Il s'agit de l'immobilisation d'un simple brin d'ADN (TN_1 : ADN) et d'un glycocluster présentant trois galactoses (TN_2 : (DMCH-MTzEG$_3$-Gal)$_3$), la FI_{635} mesurée dans ces conditions est d'environ 300 u.a. signifiant qu'il n'y a pas d'interaction avec PA-IIL. Il y a donc très peu d'interactions non spécifiques de PA-IIL avec la surface du microarray. Un témoin positif est également présent sur le microarray, il s'agit d'une molécule présentant un fucose (TP_1 : THME-MTzEG$_3$-Fuc). Le signal de FI_{635} de cette molécule est de 3125 u.a. ce qui est 10 fois supérieur aux témoins négatifs, ce qui montre que la lectine PA-IIL reconnait le fucose. De plus, le fucocluster (TP_2 : Man(proTzEG$_3$-Fuc)$_4$), est également ajouté sur le microarray comme référence tétravalente.

Si l'on s'intéresse, dans un premier temps aux molécules monovalentes présentant différents motifs saccharidiques, on s'aperçoit qu'un signal de FI_{635} est mesuré pour toutes les molécules. Elles sont donc toutes capables d'interagir avec PA-IIL dans les conditions

d'immobilisation de la molécule et cette immobilisation n'empêche pas l'interaction. Les molécules THME-HexTzMNAc-**sLewis^X**, THME-HexTzMNAc-**Lewis^X** et THME-HexTzMNAc-**Lewis^B** présentent toutes une FI_{635} plus basse que le témoin positif (TP_1 : THME-MTzEG$_3$_**Fuc**) présentant le monosaccharide fucose. Les motifs saccharidiques sLewis^X, Lewis^X et Lewis^B présentent donc moins d'affinité pour PA-IIL que le fucose. De plus, lors du criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IIL, ils avaient tous trois obtenu la note de C signifiant qu'ils ne possédaient qu'une faible affinité pour PA-IIL. Néanmoins, ici les différences de FI_{635} entre ces trois motifs saccharidiques sont significatives. L'affinité de PA-IIL vis à vis de ces trois motifs est donc: sLewis^X < Lewis^X < Lewis^B. La molécule THME-HexTzMNAc-**3FL** possède une FI_{635} de 3095 u.a. signifiant qu'elle possède une affinité pour PA-IIL équivalente au témoin positif, TP_1. Ce motif saccharidique, Lewis^A, avait obtenu la note de B lors du criblage de la bibliothèque de sucres. Enfin la molécule THME-HexTzMNAc-**Lewis^A** possède une FI_{635} (3460 u.a.) supérieure à celle du témoin positif (TP_1) signifiant qu'elle possède plus d'affinité que le fucose pour PA-IIL. Ce motif avait obtenu la note de A lors du criblage de la bibliothèque de sucres. Ces résultats obtenus avec les molécules monovalentes immobilisées sur le microarray et présentant différents motifs saccharidiques permet de donner le classement suivant d'affinité vis-à-vis de PA-IIL :

$$\text{sLewis}^X < \text{Lewis}^X \leq \text{Lewis}^B < \text{3-FL} < \text{Lewis}^A$$

Ce classement est en concordance avec les résultats obtenus lors du criblage en solution de ces sucres vis-à-vis de PA-IIL (cf. Chap. 4).

Si l'on s'intéresse maintenant à l'effet de la présentation multivalente de ces motifs saccharidiques sur l'interaction avec PA-IIL, on s'aperçoit que la multivalence engendre une augmentation de la FI_{635} par rapport au monovalent et cela pour chacun des motifs saccharidiques étudiés. La multivalence favorise donc l'interaction avec PA-IIL et conserve l'ordre d'affinité des différents motifs saccharidiques pour PA-IIL. L'effet du cœur est peu marqué avec cependant un effet légèrement favorable à l'interaction du cœur mannose par rapport au ribose pour trois types de résidus oligosaccharidiques sur cinq. Afin de mieux comprendre l'effet de ce cœur, et de distinguer l'effet de la valence versus effet de la topologie, trois cœurs pentoses et trois cœurs hexoses ont été testés.

5.2.2. Etude des interactions de PA-IIL avec des glycocluster possédant différentes topologies

5.2.2.1. Glycoclusters étudiés

Les glycoclusters présentés ici ont un linker 1 type EG_2 ou EG_4 et varient en fonction de leur motif saccharidique : Lewis^X, Lewis^B, 3FL ou Lewis^A ainsi que du cœur sur lequel est greffé les bras du glycocluster. Six cœurs ont été testés qui permettent tous une présentation centrée des bras avec différentes orientations et valences. Il s'agit de trois cœurs pentoses (Xyl, Ribo et Ara) permettant la présentation de 3 bras et de trois cœurs hexoses (Man, Glc et Gal) permettant la présentation de quatre bras (Tableau 5-17). La comparaison de l'effet du linker 1 (EG_2 vs EG_4) est détaillée au paragraphe 5.2.3.

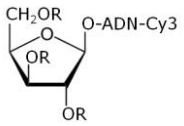
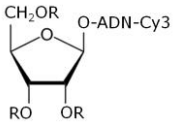
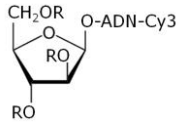
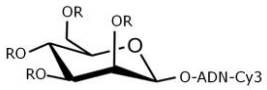
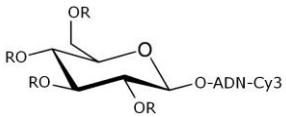
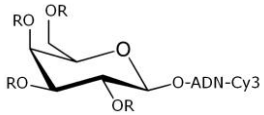
Famille	Nom	Structure
Furanose	Xylose (Xyl)	
	Ribose (Ribo)	
	Arabinose (Ara)	
Hexose	Mannose (Man)	
	Glucose (Glc)	
	Galactose (Gal)	

Tableau 5-17 : Représentation des différents cœurs pentoses et hexoses.

5.2.2.2. Influence de différents cœurs pentoses

Le tableau 5-18 présente le nom des 12 glycoclusters ayant pour, chaque motif saccharidique (Lewis^X, Lewis^B, 3FL ou Lewis^A), un des trois cœurs pentoses permettant une valence de 3 (Xylo, Ribo, Ara) et un linker 1 type EG_2.

Id.	Nom	Cœur	Linker 1	Linker 2	Sucre
136	Xylo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Xylo	EG2	MNAc	Lewis^X
115	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ribo	EG2	MNAc	Lewis^X
126	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	Ara	EG2	MNAc	Lewis^X
138	Xylo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Xylo	EG2	MNAc	Lewis^B
117	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ribo	EG2	MNAc	Lewis^B
128	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	Ara	EG2	MNAc	Lewis^B
140	Xylo(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	Xylo	EG2	MNAc	3FL
119	Ribo(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	Ribo	EG2	MNAc	3FL
130	Ara(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	Ara	EG2	MNAc	3FL
142	Xylo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Xylo	EG2	MNAc	Lewis^A
121	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ribo	EG2	MNAc	Lewis^A
132	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	Ara	EG2	MNAc	Lewis^A

Tableau 5-18 : Glycoclusters à cœur pentose étudiés.

La figure 5-19 présente la moyenne des intensités de fluorescence (FI_{635}) émises par l'Alexa647_PA-IIL interagissant avec les glycoclusters présentés ci-dessus.

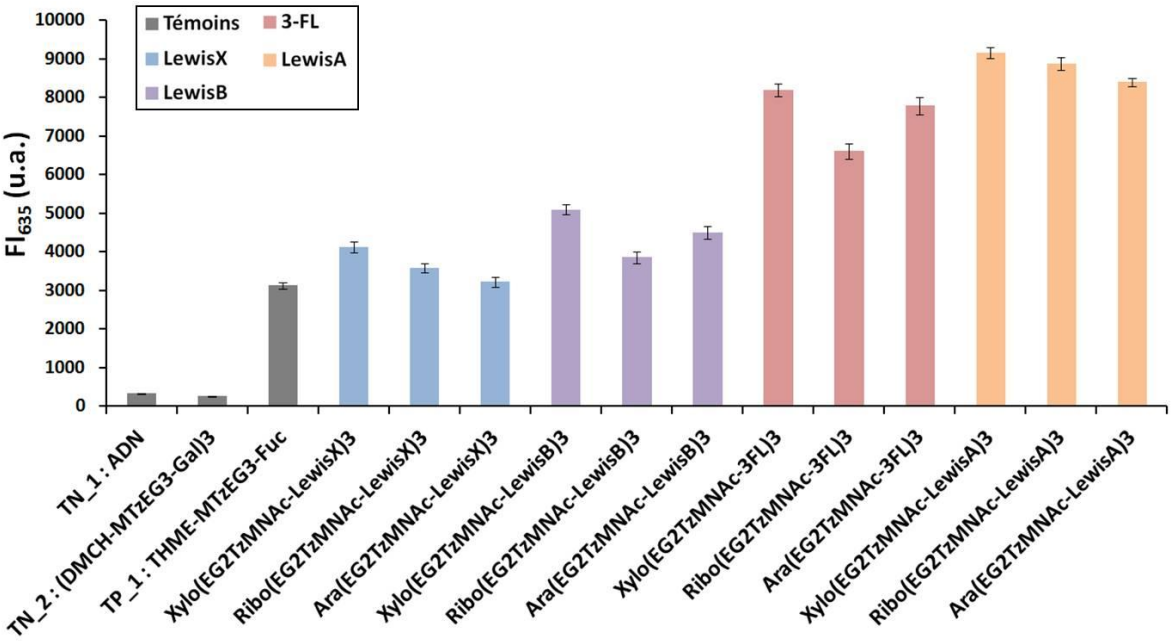


Figure 5-19 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur pentose étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Il peut être remarqué que pour les glycoclusters ayant le motif saccharidique Lewis^A, les différences de FI_{635} d'un cœur pentose à l'autre sont peu marquées. En revanche, les

glycoclusters Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$ et Ribo(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$ présentent une FI$_{635}$ nettement inférieure par rapport à leurs analogues possédant le cœur xylose ou arabinose. Et le glycocluster Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$ a aussi une FI$_{635}$ inférieure par rapport à celles des cœurs xylose et ribose.

Néanmoins, chaque motifs saccharidiques étudiés, les glycoclusters à cœur xylose (Xylo(EG$_2$TzMNAc-motif saccharique)$_3$) sont ceux ayant la plus forte FI$_{635}$. Il semblerait donc que parmi les cœurs pentoses, ce soit le cœur xylose qui permette la meilleure topologie et donc la meilleure présentation des motifs saccharidiques pour l'interaction avec PA-IIL.

5.2.2.3. Influence de différents cœurs hexoses

L'effet d'un cœur appartenant à la famille des hexoses va maintenant être discuté. Pour cela, il a été étudié 12 glycoclusters ayant pour, chaque motif saccharidique (Lewis^X, Lewis^B, 3FL ou Lewis^A), un des trois cœurs hexoses permettant une valence de 4 (Man, Glc, Gal) et un linker 1 type EG$_2$ (Tableau 5-19).

Id.	Nom	Cœur	Linker 1	Linker 2	Sucre
144	**Man(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$**	Man	EG2	MNAc	Lewis^X
153	**Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$**	Glc	EG2	MNAc	Lewis^X
161	**Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$**	Gal	EG2	MNAc	Lewis^X
146	**Man(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_4$**	Man	EG2	MNAc	Lewis^B
155	**Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_4$**	Glc	EG2	MNAc	Lewis^B
163	**Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_4$**	Gal	EG2	MNAc	Lewis^B
148	**Man(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$**	Man	EG2	MNAc	3FL
157	**Glc(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$**	Glc	EG2	MNAc	3FL
165	**Gal(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$**	Gal	EG2	MNAc	3FL
150	**Man(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$**	Man	EG2	MNAc	Lewis^A
159	**Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$**	Glc	EG2	MNAc	Lewis^A
167	**Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$**	Gal	EG2	MNAc	Lewis^A

Tableau 5-19 : Glycoclusters à cœur hexose étudiés

La figure 5-20 présente la moyenne des intensités de fluorescence (FI$_{635}$) émises par l'Alexa647_PA-IIL interagissant avec les glycoclusters présentés ci-dessus.

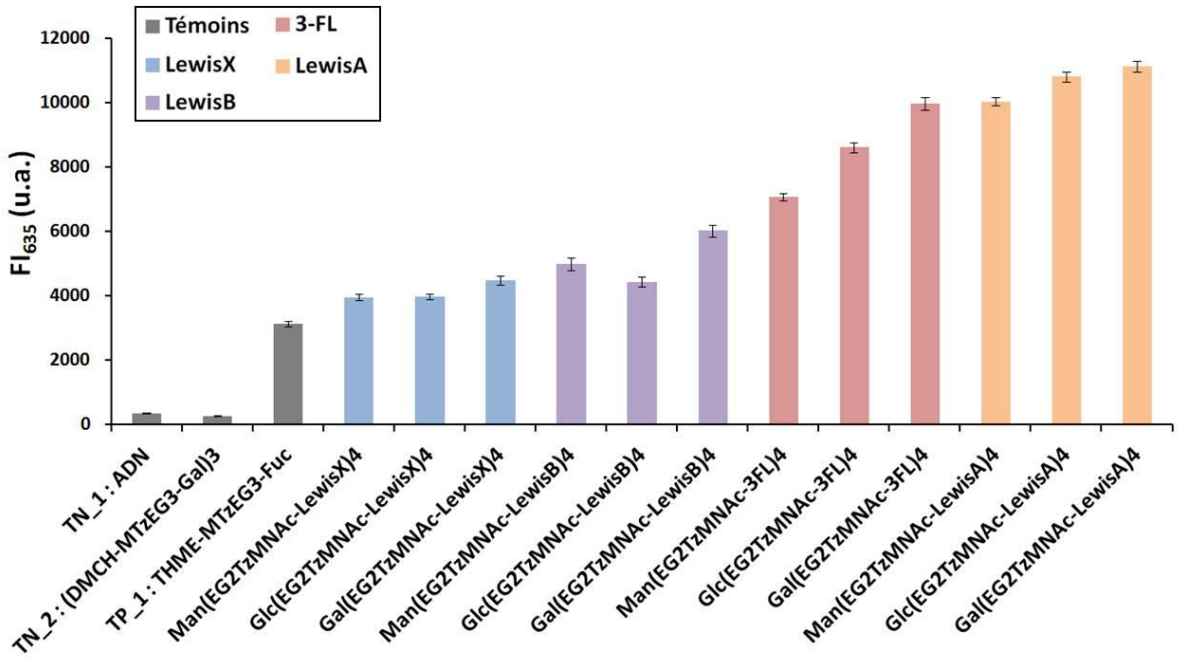


Figure 5-20 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur hexose étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Pour ce qui des glycoclusters présentant les motifs saccharidiques Lewis^X et Lewis^A, l'influence des différents cœurs hexoses sur l'interaction avec PA-IIL n'est que très peu marquée. Néanmoins, pour chaque glycocluster possédant un des motifs saccharidiques étudiés, les glycoclusters à cœur galactose (Gal(EG$_2$TzMNAc-motif saccharique)$_4$) sont ceux ayant la plus forte FI_{635}. Ensuite, à l'exception du motif saccharidique Lewis^B, les glycoclusters présentant le cœur glucose ont une plus forte FI_{635}, que ceux ayant le cœur mannose. Il semblerait donc que le classement des cœurs hexoses pour permettre l'interaction avec PA-IIL soit : Mannose ≤ Glucose < Galactose.

5.2.2.4. Comparaison trivalent/tétravalent

Afin de comparer l'effet de la multivalence sur l'interaction avec PA-IIL, il a été comparé pour chaque motif saccharidique, l'interaction du meilleur des glycoclusters trivalents (Xylo(EG$_2$TzMNAc-motif saccharique)$_3$) avec le meilleur des tétravalents (Gal(EG$_2$TzMNAc-motif saccharique)$_4$) (Figure 5-21).

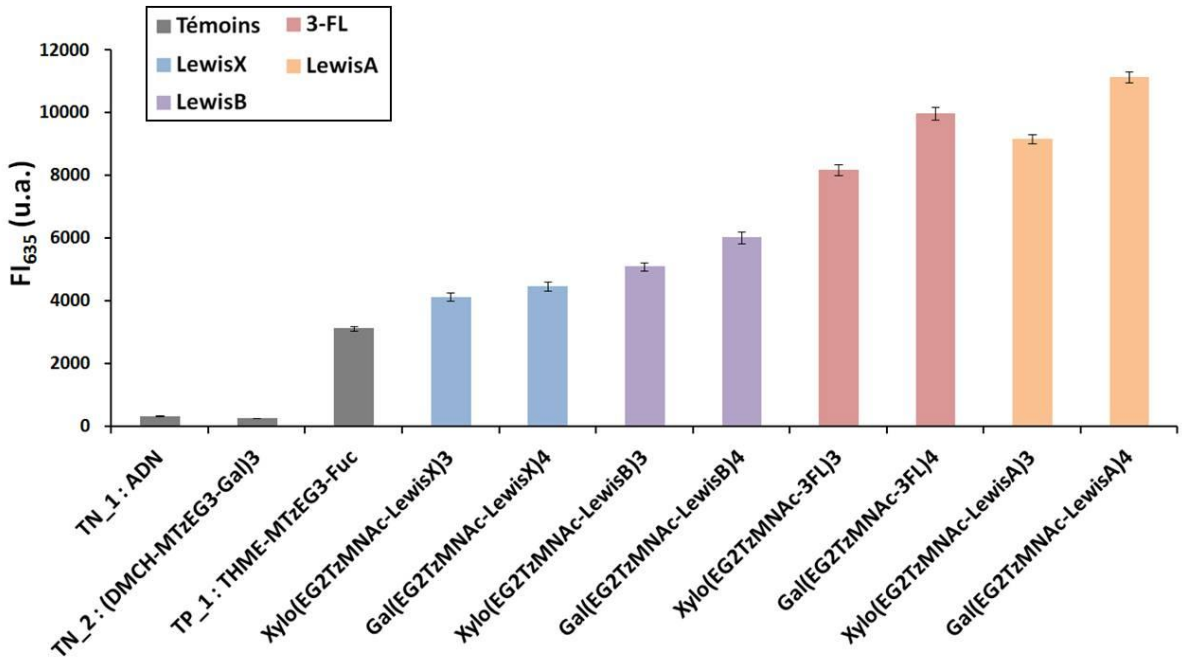


Figure 5-21 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur xylose et galactose étudiés. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Il apparait que pour chaque motif saccharidique le meilleur des glycoclusters tétravalents à cœur hexose (galactose) présente une plus forte FI_{635} que le meilleur des glycoclusters trivalents à cœur pentose (xylose). En effet, pour les glycoclusters présentant du Lewis^A, le meilleur des glycoclusters tétravalents : Gal(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_4$ à une FI_{635} de 11132 u.a et le meilleur des trivalent : Xylo(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_3$, une FI_{635} de 9163 u.a. De même, pour les glycoclusters présentant du 3-FL, le glycocluster Gal(EG_2TzMNAc-3FL)$_4$ à une FI_{635} de 9983 u.a comparé à 8186 u.a. pour le Xylo(EG_2TzMNAc-3FL)$_3$. Il semblerait donc que des glycoclusters tétravalents soient plus favorables à l'interaction avec PA-IIL. Enfin des mesures de K_d effectuées sur le microarray sont venues confirmer ces résultats où les glycoclusters Gal(EG_2TzMNAc-3FL)$_4$ et Gal(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_4$ possèdent un K_d respectivement de 53 et 39 nM contre 60 et 44 nM pour les glycoclusters Xylo(EG_2TzMNAc-3FL)$_3$ et Xylo(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_4$. Néanmoins, les différences de valeurs de K_d sont assez faibles, l'augmentation d'affinité des glycoclusters trivalents par rapport aux tétravalents semble donc être due à une augmentation de la concentration locale en motifs saccharidiques et non à un effet chélate. En effet, la lectine PA-IIL présente les sites de reconnaissance sur ses faces opposées, ce qui rend difficile l'accès simultané à deux sites de reconnaissance et diminue la probabilité d'effet chélate (cf. Figure 5-17).

5.2.3. Effet du linker 1 sur l'interaction glycocluster/PA-IIL

Afin de tenter d'atteindre simultanément les deux sites de reconnaissance sur le bord le plus court de PA-IIL (figure 15), deux linkers 1 variant par leur longueur ont été évalués. Il s'agit du diéthylène glycol (EG_2) et du tétraéthylène glycol (EG_4). Cet effet de linker a été étudié sur les glycoclusters présentant les motifs saccharidiques : Lewis^X, Lewis^B, 3-FL et Lewis^A et tous les cœurs pentoses et hexoses présentés ci-dessus. Au total, cet effet a été étudié sur 48 glycoclusters. Afin de permettre une visualisation des résultats plus claire, il ne sera présenté l'influence du linker 1 que sur les meilleurs des glycoclusters trivalents et tétravalents et cela pour chacun des motifs saccharidiques. Il s'agit donc des glycoclusters de la famille : Xylo(L1TzMNAc-motif saccharique)$_3$ et Gal(L1TzMNAc-motif saccharique)$_4$ (Figure 5-22).

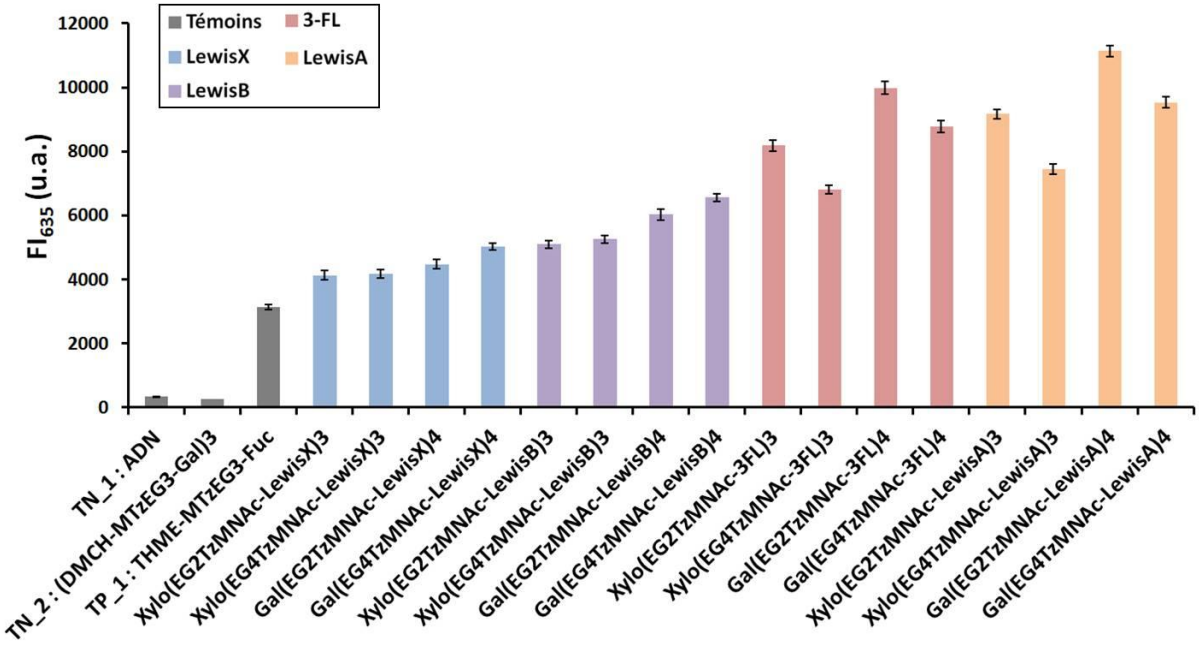


Figure 5-22 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IIL à 635 nm pour les glycoclusters à cœur xylose et galactose étudiés variant pour le linker 1(EG_2 ou EG_4). Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Pour les glycoclusters ayant une faible affinité pour PA-IIL (motifs saccharidiques : Lewis^X et Lewis^B), les valeurs de FI_{635} sont assez proches entre un même glycocluster quelque soit le linker 1 avec une tendance à une augmentation peu significative de la FI_{635}, pour un linker plus long type EG_4 par rapport à l'EG_2. En effet, si l'on compare les valeurs de FI_{635} obtenues pour les glycoclusters Gal(**L1**TzMNAc-Lewis^B)$_4$, celles-ci sont de 6024 u.a. pour le linker type EG_2 et 6555 u.a. pour le linker type EG_4.

Pour ce qui est des glycoclusters présentant une plus forte affinité pour PA-IIL (motifs saccharidiques : 3-FL et Lewis^A), l'effet du linker est plus marqué. De manière générale, les glycoclusters possédant un linker 1 type EG_4 possèdent tous une valeur de FI_{635}

significativement plus basse que ceux présentant un linker type EG_2. En effet, si l'on prend l'exemple des glycoclusters Gal(**L1**TzMNAc-Lewis^A)$_4$, ceux-ci possèdent une FI_{635} de 11132 u.a. pour un linker 1 type EG_2 et de 9532 u.a. pour un linker 1 type EG_4. Il semblerait donc que pour les glycoclusters présentant les motifs saccharidiques 3-FL et Lewis^A, l'effet du linker sur leurs affinités vis-à-vis de PA-IIL soit le suivant : $EG_4 < EG_2$.

Ces observations de l'effet du linker 1 ont aussi été faites sur les glycoclusters possédant les cœurs : arabinose, ribose, glucose et mannose.

L'augmentation de la longueur des linkers 1 (EG_4 vs EG_2) ne semble pas permettre d'atteindre simultanément deux sites (pas d'effet chélate) et semble plutôt préjudiciable probablement en raison d'un coût entropique supérieur.

5.2.4. Discussion - conclusion

Pour conclure, il a été présenté l'affinité de 50 glycoclusters ciblant PA-IIL. Il a été étudié l'affinité de différents motifs saccharidiques : sLewis^X, Lewis^X, Lewis^B, 3-FL et Lewis^A pour PA-IIL. Pour les glycoclusters présentant le sLewis^X, il a été étudié deux glycoclusters à cœur ribose et mannose et possédant un linker 1 type EG_4. Pour les glycoclusters possédant les autres motifs saccharidiques (48), l'impact de différentes topologies engendrées par trois cœurs pentoses : Xylo, Ribo et Ara et trois cœurs hexoses : Man, Glc et Gal a été étudié. Ces cœurs ont permis une valence de trois et de quatre respectivement. Il a aussi été étudié l'impact de deux types de linker 1 plus ou moins long et flexible : EG_2 et EG_4.

De cette étude, est ressorti que l'impact du linker 1 sur l'interaction avec PA-IL était assez faible avec une tendance à la diminution de l'affinité avec un linker 1 long (EG_4 vs EG_2). De plus, la multivalence a toujours engendrée un gain d'affinité pour PA-IIL par rapport au monovalent. Bien que les différences d'affinité entre une même famille de cœur (pentose ou hexose) ne furent pas très marquées, il est apparu que la meilleure des topologies tétravalentes était celle apportée par le cœur galactose et la meilleure des trivalentes, par le cœur xylose. De plus, la topologie tétravalente à cœur galactose a toujours engendré un léger gain d'affinité pour PA-IIL par rapport à la topologie trivalente à cœur xylose. Néanmoins, ce gain d'affinité n'a pas pu être attribué à un effet chélate mais plutôt à une augmentation locale de la concentration en motif saccharidique. Des mesures ITC n'ont pas été réalisées avec ces glycoclusters, ne nous permettant pas de connaitre la stœchiométrie de l'interaction. Néanmoins, l'évaluation de l'affinité du fucocluster, TP_2 : Man(proTzEG$_3$-Fuc)$_4$ vis-à-vis de PA-IIL par ITC, a montré un K_d de 166 nM avec un stœchiométrie de 0,31. Par comparaison,

le fucoside, α-MeFuc, a obtenu un K_d de 380 nM. Le potentiel relatif d'interaction du fucocluster par rapport au fucoside, α-MeFuc est donc seulement de 2 (0,5 par fucose). La stœchiométrie de l'interaction du fucocluster avec PA-IIL étant de 0.31 cela signifie qu'il y a trois fucoses d'un fucocluster qui interagissent avec PA-IIL. Au vu des résultats de K_d ne montrant pas une exaltation de l'interaction du fucocluster par rapport au fucoside, il semble peu probable qu'il s'agisse de l'association chélate de trois fucoses du fucocluster avec un même tétramère de PA-IIL. Il s'agirait plutôt de l'association de trois fucoses du fucocluster avec trois tétramères de PA-IIL. Cette observation laisse penser que nos structures de glycoclusters ne permettraient pas d'effet chélate avec PA-IIL. Néanmoins, pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de compléter cette étude avec des mesures ITC.

Enfin, plus que l'effet du linker 1 et de la topologie du glycocluster, le motif saccharidique présenté influence fortement l'interaction avec PA-IIL. Le classement de l'interaction de ces différents motifs saccharidiques avec PA-IIL est le suivant :

$$\text{sLewis}^X < \text{Lewis}^X \leq \text{Lewis}^B < \text{3-FL} < \text{Lewis}^A$$

Des mesures de K_d effectuées sur le microarray avec des glycoclusters tétravalents Gal(EG_2TzMNAc-motif saccharidique)$_4$, sont également venues appuyer ce classement. En effet, ces glycoclusters possèdent un K_d autour de 98 nM pour ceux ayant comme motifs saccharidiques du Lewis^X ou du Lewis^B, de 53 nM pour celui ayant le motif saccharidique 3-FL et de 39 nM pour le Lewis^A. Comme expliqué dans le chapitre 4 et par la littérature, l'analyse de l'interaction de ces oligosaccharides avec PA-IIL confirment aussi le classement (Mitchell et al., 2002; Perret et al., 2005; Topin et al., 2013; Wu et al., 2006). Dans la littérature, la quasi-totalité des molécules multivalentes ciblant PA-IIL sont fonctionnalisées avec du fucose. A notre connaissance seuls deux glycoclusters di et trivalents fonctionnalisés avec le disaccharide, Fucα1-4GlcNAc, qui est un motif présent dans les sucres type Lewis^A ont été synthétisés et étudiés par ITC pour leur affinité vis-à-vis de PA-IIL. Ils n'ont pas, non plus, permis d'obtenir un effet chélate et présentent une affinité comparable aux meilleurs des fucoclusters connus aujourd'hui de l'ordre de la dizaine de nM (Marotte et al., 2007a).

Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude avec d'autres topologies de glycoclusters afin d'espérer obtenir un effet chélate et renforcer d'autant l'interaction avec PA-IIL.

5.3. Etude d'affinité des glycoclusters ciblant les lectines des *pili* et du flagelle

Nous avons vu que *Pseudomonas aeruginosa* possède des *pili* et un flagelle qui sont impliqués dans sa virulence (cf. 1.1.5.3). Pour résumer, ces structures permettent à PA de se déplacer et d'adhérer sur une surface afin d'initier la formation de micro-colonies qui formeront à terme le biofilm. Pour cela, les *pili* et le flagelle de PA possèdent plusieurs lectines.

Pour ce qui concerne les *pili* de PA, ceux-ci appartiennent à deux familles, les *pili* de type IV et les *pili* assemblés par la voie « Chaperonne-Usher » (CUP). Les lectines des *pili* de type IV étudiés ici sont la piline PilA qui constitue le filament du *pilus* et la lectine PilY1 qui peut être présente à son extrémité. Pour ce qui est des *pili* assemblés par la voie « Chaperonne-Usher » (CUP), il a été étudié la lectine CupB6 (cf. 1.2.2). Enfin, il a été étudié la flagelline FliC qui constitue le filament du flagelle et la lectine FliD qui en constitue sa coiffe (cf. 1.2.1). Toutes les structures cristallines de ces lectines n'ont pas été résolues et pour celles qui l'ont été, elles n'ont pas été réalisées avec un co-cristal ligand/lectine. De plus, leurs ligands naturels ne sont pas complètement connus. Néanmoins différentes études *in-vitro*, impliquant notamment l'utilisation de souches de PA mutées pour l'expression d'une de ces lectines, ont permis d'identifier des ligands potentiels (Tableau 5-20).

Lectine	Ligand potentiel	Rèf.
FliD	**Lewis X** (Souche PAO1)	(Scharfman et al., 2001)
	Sialyl-Lewis X (Souche PAO1)	(Colomb et al., 2014; Scharfman et al., 2001)
FliC	**GM1** et **aGM1**	(Feldman et al., 1998)
	Mucine : Muc1	(Lillehoj et al., 2002)
	Lewis X (Souche PAO1)	(Scharfman et al., 2001)
PilA	**aGM1** et **aGM2**	(Gupta et al., 1994; Saiman and Prince, 1993; Sheth et al., 1994)
PilY1	Récepteur sur surface basolatérale des cellules épithéliales.	(Heiniger et al., 2010)
CupB6	**Lewis B**	CFG 2009 (Anne Imberty)

Tableau 5-20 : Ligands potentiels des différentes lectines des pili et du flagelle de Pseudomonas aeruginosa.

5.3.1. Glycoclusters étudiés

Il a été utilisé des glycoclusters présentant différents motifs saccharidiques afin d'étudier leur interaction avec les lectines des *pili* et du flagelle (Tableau 5-21). Ces motifs, sont notamment des ligands avérés ou putatifs des sept lectines testées pendant cette thèse.

Id.	Nom	Motif saccharidique	Lectine cible
G1	Man(proTzEG$_3$-Gal)$_4$	Gal	PA-IL
TP_2	Man(proTzEG$_3$-Fuc)$_4$	Fuc	PA-IIL
152	Man(EG$_4$TzMNAc-sLewis^X)$_4$	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	**FliD**
145	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	**FliC ; FliD**
176	Man(EG$_2$TzM-triaose_Lewis^X)$_4$	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc	**FliC ; FliD**
151	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	PA-IIL
147	Man(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	**CupB6**
174	Man(EG$_4$TzMNAc-aGM2)$_4$	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc	**PilA**
175	Man(EG$_2$MTzpro-GalNAcβ1-4Gal)$_4$	GalNAcβ1-4Gal	**PilA**

Tableau 5-21 : Liste des glycoclusters étudiés pour chacune des lectines avec pour chacun d'entre eux la lectine ciblée. Les motifs saccharidiques sont rattachés par leur extrémité réductrice (à droite) au bras du galactocluster.

Chacun de ces glycoclusters ont été immobilisés sur le microarray et leur interaction avec les lectines FliD, FliC, PilA, PilY1 et CupB6 marquées à l'Alexa647 a été testée par des mesures de fluorescence à 635 nm. Pour la lectine FliD, il a également été testé une détection indirecte de l'interaction avec les glycoclusters grâce à l'utilisation d'anticorps marqués à l'Alexa647.

5.3.2. Caractéristiques de production des différentes lectines étudiées

Trois lectines des *pili* : PilA, PilY1 et CupB6 et deux du flagelle : FliC et FliD ont été étudiées. La production de ces lectines a été réalisée par le Dr. Olivier Vidal de l'UGSF de Lille. Celles-ci ont été faites en hétérologue c'est-à-dire en utilisant une souche d'*E. coli* modifiée avec un vecteur d'expression contenant le gène de la lectine d'intérêt. Suivant, le vecteur d'expression utilisé, pET100 ou pGEX-6P-1, la lectine a été produite avec le tag 6x-His (polyhistidine) ou GST (Glutathione S-transferase) afin de faciliter sa purification par chromatographie d'affinité. De plus, les protéines fusions produites présentent, entre le tag et la lectine d'intérêt, une séquence protéique spécifiquement reconnue par des protéases permettant d'enlever le tag de la lectine après leur purification.

Différentes productions hétérologues de ces lectines issues de différentes souches de PA et produites dans différentes souches de *E.coli* ont été réalisées. Le tableau 5-22 présente les caractéristiques de chacune de ces lectines hétérologues.

Lectine (Souche)	Système d'expression	Commentaires
PilA (PAO1)	E.coli BL21 avec vecteur pGEX-6P-1 (tag GST)	- PilA tronquée de 33 résidus en Nter pour éviter la formation d'agrégats - MM : 12,7 kDa - Tag GST éliminé - Protéine pure - Production de 450 µg
PilA (PAK)	**E.coli Shuffle avec vecteur pET100 (tag 6xHis)**	**- PilA tronquée de 33 résidus en Nter pour éviter la formation d'agrégats et avec boucle DSL formée (disulfide bonded loop)** **- MM : 16 kDa** **- Présence du tag 6xHis en Nter (30 résidus supplémentaires)** **- Protéine pure** **- Production de 100 µg**
PilY1 (PAO1)	E.coli BL21 avec vecteur pET100 (tag 6xHis)	- Production en conditions dénaturantes (urée) car présence de corps d'inclusion, suivie d'une renaturation par dialyse - MM : 130 kDa - Présence du tag 6xHis en Nter (30 résidus supplémentaires) - Protéine non pure (présence de protéines contaminantes sur SDS-PAGE) - Production de 400 µg de protéines totales (PilY1 + contaminantes)
CupB6 (PAO1)	E.coli BL21 avec vecteur pGEX-6P-1 (tag GST) et E.coli Shuffle avec vecteur pGEX-6P-1 (tag GST)	- Tag GST partiellement éliminé - Protéine non pure - Production de 100 µg E.coli BL21 et 180 µg chez E.coli Shuffle (Protéines totales)
FliD (PA14, PAO1 et PAK)	E.coli BL21 avec vecteur pET100 (tag 6xHis)	- Protéines sous forme monomériques, ne s'associant pas en deux anneaux pentamériques - MM ≈ 53 kDa - Présence du tag 6xHis en Nter (30 résidus supplémentaires) - Protéines relativement pure (traces de protéines contaminantes sur gel SDS-PAGE) - Production de 23 mg de FliD PA14, 2.2 mg FlID PAO1 et 1.12 mg FliD PAK
FliD (PAK)	**E.coli BL21 avec vecteur pGEX-6P-1 (tag GST)**	**- Protéine native de haut poids moléculaire, s'associe probablement en deux anneaux pentamériques** **- MM : 51 kDa** **- Tag GST éliminé** **- Protéine pure** **- Production de 5,6 mg**
FliD (PAK)	E.coli Shuffle avec vecteur pGEX-6P-1 (tag GST)	- Protéine native de haut poids moléculaire, s'associe probablement en deux anneaux pentamériques - MM : 51 kDa - Tag GST éliminé - Protéine pure - Production de 200 µg
FliC (PAO1)	E.coli BL21 avec vecteur pET100 (tag 6xHis)	- Production en présence d'inhibiteurs de protéases car sinon dégradation - Dialyse d'une partie pour éliminer les inhibiteurs - MM : 53 kDa - Présence du tag 6xHis en Nter (30 résidus supplémentaires) - Protéine non pure - Production de 2 mg de protéines totales

Tableau 5-22 : Description des différentes lectines produites en hétérologue.

La structure de la lectine PilA est composée d'une longue hélice α hydrophobe en N-terminale, de feuillets β en C-terminal, d'une boucle reliant l'hélice α au feuillet β et d'une boucle DSL (disulfide-bonded loop) située à l'extrémité C-terminale de la protéine (cf. 1.2.2.1) (Nguyen et al., 2010). Il a été montré que la boucle DSL était essentielle au bon repliement de PilA (Harvey et al., 2009). De plus, l'extrémité N-terminale des pilines semblerait jouer un rôle dans leur polymérisation pour former le filament. L'extrémité C-terminale permettrait l'interaction avec des sucres type aGM1 et aGM2 (Hazes et al., 2000). La souche E. coli Shuffle a été spécialement choisie pour sa capacité à former des ponts disulfures. Ainsi la lectine PilA de la souche PAK produite chez ce microorganisme (Tableau 5-22, en gras) et tronquée de 33 acides aminés en N-ter pour éviter sa polymérisation en filament et la formation d'agrégats, devrait avoir une boucle DSL formée permettant le bon repliement de la partie globulaire Cter où l'interaction est présumée se faire.

Pour ce qui est de la lectine FliD, il a été montré par microcopie électronique que les monomères de cette protéine s'assemblaient en deux pentamères pour former deux anneaux superposés (cf. 1.2.1.2) (Ikeda et al., 1996). L'analyse sur gel d'électrophorèse en conditions natives de FliD produite grâce au vecteur d'expression pGEX-6P-1 et dont le GST Tag a été retiré, a montré qu'elle ne migrait que très peu dans le gel laissant supposer un fort poids moléculaire pouvant correspondre au docamère (Figure 5-24a, puits 8). Ceci n'a pas été observé avec les lectines FliD produites avec le vecteur d'expression pET100 et donc le tag 6xHis n'a pas pu être retiré.

Enfin, il a été étudié un extrait de *pili* obtenus de la souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* mutée pour l'expression de FliC c'est-à-dire ne pouvant pas produire de flagelle (Heiniger et al., 2010). Cet extrait est donc essentiellement composé de la piline PilA mais aussi dans de plus faibles proportions des autres protéines composant les *pili* comme PilY1. De même, il a été étudié un extrait de flagelles obtenus de la souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* mutée pour l'expression de PilA c'est-à-dire ne pouvant pas produire de *pili* (Feldman et al., 1998; Kunzelmann et al., 2006). Cet extrait est donc essentiellement composé de la flagelline FliC mais aussi dans de plus faibles proportions des autres protéines composant les flagelles comme FliD.

5.3.3. Résultats d'affinité sur microarray

5.3.3.1. Détection directe de l'affinité grâce aux Alexa647_lectines

Chacun des lots de lectines présentés ci-dessus ainsi que les extraits de *pili* et de flagelles ont donc été testés sur microarray. Pour cela, après avoir effectué le marquage avec le fluorophore Alexa647 de chacune des lectines et des extraits, leur affinité vis-à-vis des glycoclusters présentant 9 motifs saccharidiques différents a été testée. D'après les ligands potentiels décrits dans la littérature, chacune de ces lectines devrait préférentiellement interagir avec un ou plusieurs de ces glycoclusters (Tableau 5-21). Par exemple, la lectine PilA devrait préférentiellement interagir avec les glycoclusters Man(EG_4TzMNAc-aGM2)$_4$ et Man(EG_2MTzpro-GalNAcβ1-4Gal)$_4$.

La figure 5-23 présente un exemple de résultats obtenus avec la lectine **PilA** de la souche PAK produite chez E. coli Shuffle et **FliD** de la souche PAK chez E. coli BL21 (Tableau 5-22, en gras) testées à deux concentrations différentes 0,5 µM et 2,5 µM. Ce sont les deux lectines produites en hétérologue qui ont le plus de chance d'avoir un repliement leur permettant d'être fonctionnelle.

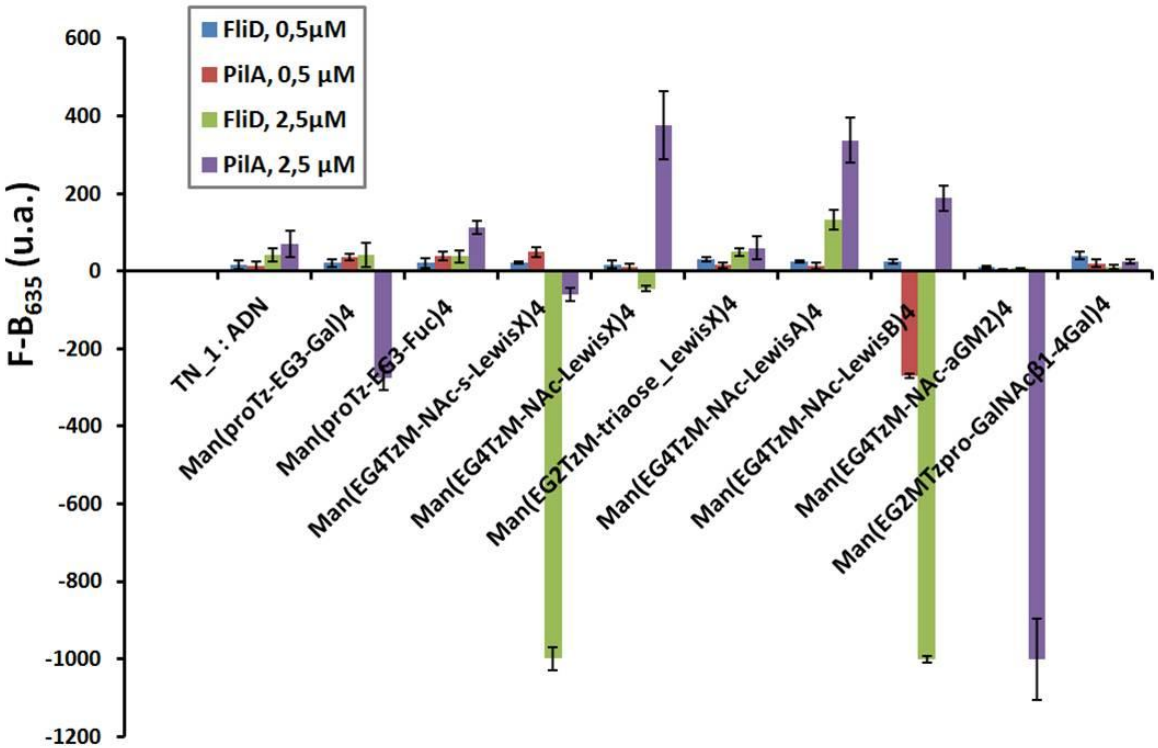


Figure 5-23 : Moyenne des intensités de fluorescence à 635nm corrigée par le signal du bruit de fond (F-B_{635}) pour les lectines PilA et FliD à 0.5 µM et 2.5µM pour chacun des glycoclusters testés.

Le signal de fluorescence n'excède pas 400 u.a., ce qui est faible par rapport aux signaux de fluorescence que nous avions observés avec PA-IL et PA-IIL. Même si ce signal est environ 4 fois supérieur au TN_1 pour les meilleurs glycoclusters, souvent, un tel niveau de fluorescence engendre une faible reproductibilité des affinités mesurées. Ce même type de résultats a été obtenu pour les autres lectines des *pili* et du flagelle présenté dans le tableau 5-22. Cela ne permet donc pas de mettre en évidence de manière significative l'interaction des lectines du *pili* et du flagelle avec les glycoclusters immobilisés.

A cela plusieurs hypothèses peuvent être faites :

- Les ligands naturels de ces lectines ne sont pas connus. De plus, pour la lectine PilY1, il n'est pas non plus reporté de ligand potentiel dans la littérature. Les glycoclusters testés ici ne présentent donc peut être pas le motif saccharidique reconnu par cette dernière.
- La production en hétérologue de ces lectines peut engendrer un mauvais repliement de la protéine et ainsi affecter son activité. Par exemple, pour certaines lectines, le 6xHis tag n'a pas pu être enlevé ou encore la purification a due être faite en conditions dénaturantes.
- Certaines lectines ne sont pas totalement pure, la purification n'ayant pas permis d'éliminer toutes les protéines contaminantes.
- Enfin, une étape de marquage des lectines à l'Alexa647 est nécessaire afin de pouvoir mesurer leur interaction avec les glycoclusters. Ce marquage pourrait également affecter leur structure tridimensionnelle.

Afin de vérifier l'effet du marquage à l'Alexa647 sur les deux lectines : **PilA** de la souche PAK produite chez E. coli Shuffle et **FliD** de la souche PAK chez E. coli BL21 ayant le plus de chance d'avoir un bon repliement, une analyse sur gel d'électrophorèse en conditions natives et dénaturantes a été faite avec les lectines non marquées et marquées à l'Alexa647 (Figure 5-24).

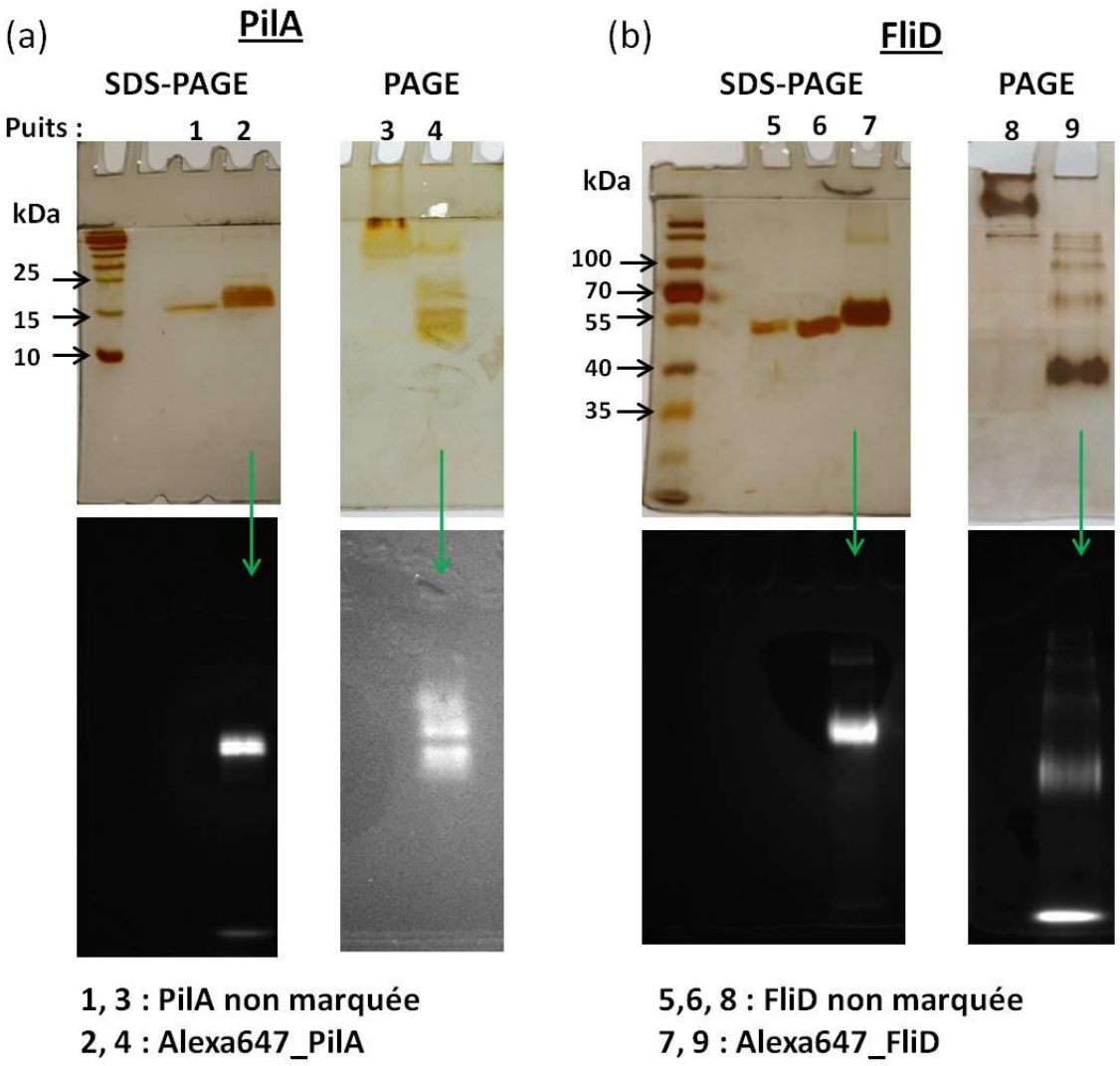


Figure 5-24 : Gels d'électrophorèse (15 % et 8 % d'acrylamide, pour PilA et FliD respectivement) obtenus en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et natives (PAGE). Pour chacune des conditions, une photo des gels est prise après coloration au nitrate d'argent (haut) et sous excitation à 635 nm afin de détecter l'Alexa647 (bas).

Pour les deux lectines (PilA et FliD), les photos des gels d'électrophorèse prises en excitant à la longueur d'onde de 635 nm montrent que le marquage des lectines a fonctionné. En effet, des bandes fluorescentes ont été observées dans les puits où les conjugués Alexa647_lectines sont présentes. L'analyse des gels sera ensuite faite en comparant les photos des gels après coloration au nitrate d'argent qui révèle la présence de toutes les protéines, marquées et non marquées à l'Alexa647.

Pour ce qui concerne la lectine PilA (Figure 5-24a), sur le gel d'électrophorèse obtenu en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), PilA non marquée (puits 1) migre juste au dessus du niveau du marqueur de poids moléculaire de 15 kDa ce qui correspond bien au monomère de PilA (16 kDa). Pour l'Alexa647_PilA (puits 2) il est observée plusieurs bandes au dessus les unes des autres d'environ 16-20 kDa pouvant correspondre à la protéine PilA possédant un à

plusieurs fluorophores Alexa647 (1.2 kDa). En revanche, en conditions natives (PAGE), il est observé que l'Alexa647_PilA migre plus loin dans le gel que PilA non marquée. Il peut être supposé que soit PilA non marquée s'est multimérisée en filament ce qui ralentit sa migration ou que soit Alexa647_PilA migre plus loin grâce à une plus forte charge négative globale apporté par le fluorophore chargé négativement. Cette dernière hypothèse semble plus probable puisque PilA est tronquée pour sa partie N-ter qui jouerait un rôle dans sa polymérisation.

Pour ce qui concerne la lectine FliD, sur le gel obtenu en conditions dénaturantes, il est observé, pour FliD non marquée, une bande à environ 50 kDa correspondant au monomère de FliD (puits 6) et une bande de poids moléculaire légèrement plus élevée pour Alexa647_FliD (puits 7). En ce qui concerne, le gel d'électrophorèse obtenu en conditions natives, une bande majoritaire pour FliD non marquée est observée en haut du gel de migration pouvant correspondre à une structure de fort poids moléculaire et qui pourrait être attribuée au decamère de FliD. En revanche, pour l'Alexa647_FliD, il est observé plusieurs bandes dans le gel pouvant également être dues à un effet de la charge de l'Alexa647 mais aussi pouvant être attribuées à la démultimérisation de FliD en monomère, dimère, trimère, ... Il semblerait donc que le marquage de FliD engendre la démultimérisation du decamère. Enfin, l'absence d'interaction observée de FliD avec Man(EG_4TzMNAc-sLewis^X)$_4$, Man(EG_4TzMNAc-Lewis^X)$_4$ ou Man(EG_2TzM-triaose_Lewis^X)$_4$ pourrait être du soit au marquage par l'Alexa647 (qui tout au moins influence sa structure quaternaire) ou le fait que la lectine FliD testée est issue de la souche PAK de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, dans la littérature, c'est FliD de la souche PAO1 qui a démontré une certaine affinité pour le Lewis^X et le sLewis^X. Les deux lectines de ces deux souches (PAK et PAO1) ne possédant que 43 % d'identité, ne reconnaissent peut-être pas les mêmes ligands.

5.3.3.2. Détection indirecte de l'affinité grâce à des anticorps

Afin de déterminer si le marquage des lectines avec l'Alexa647 perturbe leur structure et donc leur capacité de reconnaissance, nous avons utilisé des anticorps marqués dirigés contre ces lectines (Figure 5-25). Nous disposions d'un anticorps anti-FliD. Des anticorps anti-FliC et anti-PilA sont en cours de production.

Ainsi, l'affinité de FliD de PAK (BL21) (Tableau 5-22, en gras) et de l'extrait de flagelles vis-à-vis des différents glycoclusters immobilisés sur le microarray a été testée en utilisant soit :

- l'Alexa647_anticorps anti-FliD (produits chez le lapin)
- soit l'anticorps anti-FliD et un l'Alexa647_anticorps anti-lapin commercial.

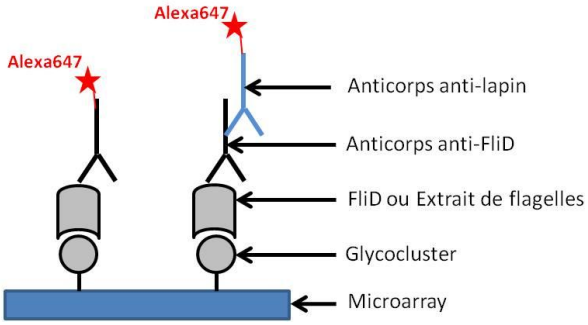


Figure 5-25 : Représentation schématique de la détection indirecte de l'interaction lectine/glycocluster grâce à l'utilisation d'anticorps.

Ces deux types de détections basées sur des réactions immunologiques n'ont pas, non plus, permis de détecter la présence de FliD après interaction avec les différents glycoclusters que ce soit en utilisant FliD PAK (BL21) ou l'extrait de flagelle. Plusieurs hypothèses peuvent également être émises :

- Les conditions expérimentales (quantité de lectine, anticorps, lavages, …) ne seraient pas optimales pour permettre la détection de l'interaction.
- En ce qui concerne FliD de la souche PAK, elle ne possède pas forcément les mêmes ligands que FliD de la souche PAO1 et/ou sa production en hétérologue pourrait la rendre inactive.
- En ce qui concerne l'extrait de flagelle provenant de la souche PAO1, la lectine majoritairement présente est FliC ce qui ne permettrait pas la détection de FliD par l'anticorps anti-FliD (quantité trop faible).

5.3.4. Conclusion - Perspectives

Nous venons de voir qu'il n'est pas aisé de mettre en évidence, l'interaction des lectines issues des *pili* et du flagelle de PA avec des glycoclusters immobilisés sur le microarray. La production de ces lectines en hétérologue n'est pas non plus aisée. En effet, ce sont toutes des protéines rattachées à des organelles de PA (*pili*, flagelle), leur mise en solution peut donc fortement affecter leur structure. De plus, nous avons vu grâce à une analyse sur gels d'électrophorèse que le marquage à l'Alexa647 des lectines FliD et PilA semblait affecter au

moins leur structure quaternaire. Enfin, FliD étant issue de la souche PAK, il se peut que les glycoclusters immobilisés ne soient pas ses ligands.

Pour pallier à ces problèmes, il a été décidé de tester des extraits de *pili* et flagelles directement issus de PA ainsi qu'une méthode de détection indirecte de l'interaction avec les glycoclusters via l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces lectines. Les premiers essais n'ont pas été concluants. Cependant, nous ne disposons actuellement que de l'anticorps dirigé contre FliD, lectine non majoritairement présente dans l'extrait de flagelle. Il sera donc intéressant de poursuivre les essais avec les anticorps anti-PilA et anti-FliC. De plus, les *pili* et le flagelle de PA se trouvant rattachés sur la face externe de la cellule bactérienne, il serait intéressant de tester l'affinité des différents glycoclusters sur les bactéries entières de PA adsorbées sur le microarray. Pour cela, il pourrait être fait une étude comparative entre différents mutants de *Pseudomonas aeruginosa* comme le mutant PilA et le mutant FliC et la souche sauvage.

5.4. Conclusion générale

Plusieurs lectines de *Pseudomonas aeruginosa* ont été étudiées dans ce chapitre : PA-IL, PA-IIL, FliC, FliD, PilA, PilY1 et CupB6. Ce sont des facteurs de virulence qui apparaissent comme des cibles pertinentes quant à la recherche de traitements thérapeutiques contre les infections à PA.

Nous avons présenté l'affinité d'une bibliothèque de glycoclusters vis-à-vis des lectines PA-IL et PA-IIL. Il est ressortit pour chacune des deux lectines, les paramètres importants régissant une forte interaction avec les glycoclusters.

Pour PA-IL, il a notamment été montré que la présence d'un aglycone aromatique sur les bras du glycocluster favorisait l'interaction. L'optimisation de cet aglycone aromatique a permis de gagner en affinité pour PA-IL sans néanmoins passer du nM au pM. L'étude par modélisation moléculaire des galactosides aromatiques a montré que les cycles aromatiques permettaient la création d'interactions supplémentaires type π-stacking, T-shaped avec les résidus aromatiques de PA-IL (His50, Pro51 et Pro38), ce qui est également rapporté dans la littérature.

Pour PA-IIL, il a été montré que la présentation d'un motif saccharidique type 3-FL et Lewis^{A} par le glycocluster favorisait l'interaction. Cependant, il ne semblerait pas que la topologie des glycoclusters permette un effet chélate. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude

avec des glycoclusters présentant des bras plus longs et rigides pour espérer l'interaction simultanée avec au moins deux sites d'un tétramère de PA-IIL.

L'étude de l'affinité sur microarray des lectines issues des *pili* et du flagelle de *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas permis de mettre en évidence une interaction spécifique avec les glycoclusters testés. Un bel espoir est porté par soit l'utilisation d'anticorps anti-lectines des *pili* et du flagelle et/ou soit l'utilisation de bactéries entières pour détecter une interaction avec les glycoclusters.

Enfin, l'activité du galactocluster Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$ (K_d = 36 nM) vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* de la souche PAO1 a montré qu'il pouvait déstabiliser la formation du biofilm (Ligeour et al., 2015b) (Figure 5-26).

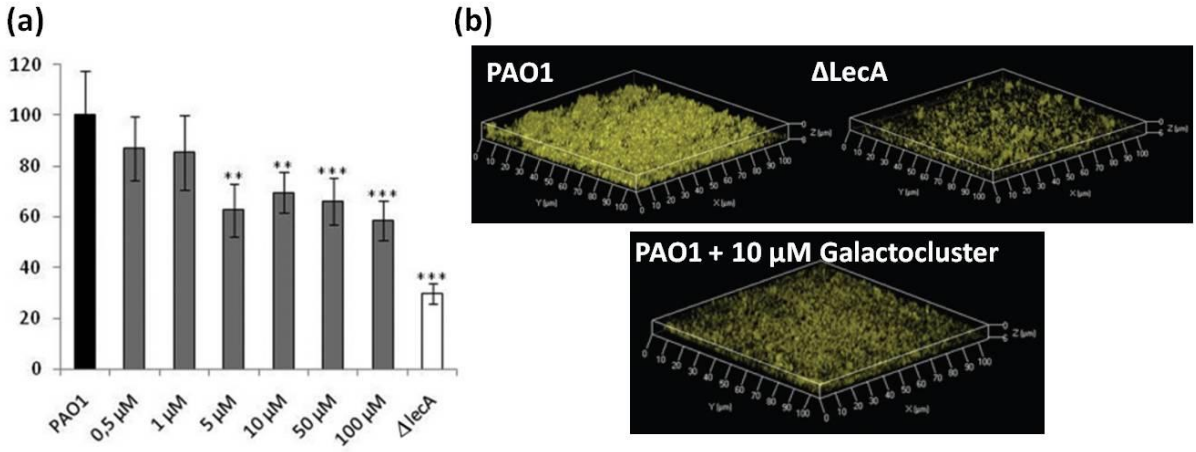


Figure 5-26 : Quantification par fluorescence du biofilm de Pseudomonas aeruginosa PAO1 en présence d'une concentration croissante de Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$ (a) et images de microscopie confocale d'un biofilm de 24 h de la souche sauvage PAO1 avec ou sans galactocluster et du mutant de PA-IL (ΔLecA) (b). Adapté de (Ligeour et al., 2015b).

En effet, le Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$ permet d'inhiber de 40 % le développement du biofilm de PA dès la concentration de 5 µM. De plus, grâce à l'analyse des images de microscopies confocales, il apparait que le biofilm présente en moyenne une épaisseur 3 à 4 fois moins importante en présence de 10 µM de galactocluster (Ligeour et al., 2015b). En vue d'un développement de médicament, il serait donc intéressant d'étudier l'effet *in-vivo* de ce galactocluster sur un modèle murin de mucoviscidose.

Conclusions et perspectives

Les sept lectines étudiées pendant cette thèse sont des facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* impliqués dans l'adhésion et la formation de son biofilm sur les tissus de l'hôte. Les cibler avec des leurres moléculaires est une stratégie innovante pour combattre les infections causées par PA. Cette stratégie nourrit l'espoir que l'utilisation d'une telle approche pourrait rendre plus vulnérable PA aux traitements antibiotiques et éviter la formation de biofilm à l'origine des infections chroniques.

Cette thèse a donc porté sur le criblage sur microarray, de bibliothèques de molécules (glycoclusters, oligo- et polysaccharides) vis-à-vis de ces lectines. Il a principalement été étudié deux lectines de PA : PA-IL et PA-IIL et des études préliminaires ont été faites avec des lectines du flagelle (FliC, FliD) et des *pili* (PilA, PilY1, CupB6) de PA. Cette thèse a aussi porté sur la validation de l'outil glycocluster-microarray pour les mesures d'affinité (IC_{50} et K_d) réalisées entre les glycoclusters et les lectines de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le microsystème développé au laboratoire pour étudier les relations structure-affinité entre ces leurres moléculaires et les lectines ciblées est une lame de verre microstructurée sur laquelle sont immobilisés des glycoclusters par hybridation d'ADN (DDI). Les glycoclusters possèdent un fluorophore, le Cy3, qui permet le contrôle de l'immobilisation par une lecture de fluorescence et donne accès à la densité relative en glycoclusters.

Nous nous sommes premièrement intéressés à l'impact de la densité de surface en glycocluster sur les mesures d'affinité avec les lectines de PA. Pour cela, la densité de surface en glycocluster a été modulée par la quantité d'ADN immobilisée de façon covalente sur le microarray. Le signal de fluorescence émis par les Cy3_glycoclusters a ensuite permis d'évaluer la densité relative en glycoclusters. De plus, nous avons vérifié, grâce à une étude AFM menée avec la plus forte densité de surface en glycoclusters, qu'un effet cluster de surface n'est pas possible sur notre microarray. Ainsi, notre microarray permet d'évaluer

l'effet cluster dû à la multivalence du glycocluster en lui-même. Cinq densités de surface ont été étudiées et cela pour deux glycoclusters G1 et G2 ciblant PA-IL avec respectivement une faible et forte affinité. Pour chacune de leurs densités de surface, une mesure d'IC_{50} et de K_d a été effectuée. L'étude a clairement montré que la mesure des valeurs d'IC_{50} est dépendante de la densité de surface en glycocluster. C'est pourquoi, seuls des IC_{50} obtenus dans des conditions expérimentales similaires peuvent être comparés. Grâce à la mesure de la fluorescence émise par les glycoclusters, une correction peut être envisagée si les conditions d'acquisition de ce signal sont comparables (appareillage, puissance, focus, …). En revanche, il a été montré que la mesure des valeurs de K_d ne dépend pas de la densité de surface en glycocluster. Par contre, il a été souligné que, pour des glycoclusters présentant des fortes affinités pour la lectine testée (de l'ordre de la dizaine de nM), il est nécessaire de diminuer la densité de surface en glycocluster pour obtenir une valeur de K_d robuste. De plus, il a été montré que le glycocluster-microarray permet d'obtenir une valeur de K_d avec un coefficient de variation inférieur à 10 %.

Dans un deuxième temps, nous avons présenté le criblage d'une bibliothèque de 156 oligo- et polysaccharides issus du monde du vivant et provenant de l'OligoTech® de la société Elicityl. Pour cela, une méthode originale de criblage a été développée qui consiste à mettre en compétition les sucres de la bibliothèque avec des glycoclusters de référence immobilisés sur le microarray pour lier une lectine. Grâce à la microstructuration du microarray, quatre concentrations de sucres ont été testées pour évaluer le potentiel d'inhibition de l'interaction glycocluster/lectine des sucres. Ce criblage a permis d'identifier 44 candidats capables d'interagir avec PA-IL et 36 avec PA-IIL. Celui-ci a montré que PA-IL interagit préférentiellement avec les galactomannanes et les oligosaccharides possédant un galactose relié en α1-3 ou α1-4 à son extrémité non réductrice comme par exemple l'antigène P. Pour PA-IIL, le test a révélé que cette lectine interagit fortement avec un mannane extrait de levure possédant un fort degré de ramification de Manα1-2/Manα1-3 et avec les oligosaccharides possédant un fucose ramifié en α1-3 et α1-4 comme les antigènes $Lewis^A$ et ceux possédant le motif 3-Fucosyllactose. Les résultats de ces deux criblages sont en accord avec la littérature ce qui valide la méthode de criblage. Du criblage de la bibliothèque de sucres vis-à-vis de PA-IL et PA-IIL a été sélectionné 12 sucres qui ont permis la synthèse de 73 glycoclusters (18 ciblant PA-IL et 55 ciblant PA-IIL).

La méthode de criblage développée, bien que plus consommatrice en matériel que les méthodes conventionnelles de criblage sur glycoarray, présente l'avantage de permettre la

reconnaissance en solution de l'interaction sucre/lectine ne nécessitant pas de modifier les sucres pour leur immobilisation. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite l'utilisation de glycoclusters de référence rendant impossible le criblage de lectines n'ayant pas de ligand connu. Pour les lectines du flagelle et des *pili* de PA, des glycoclusters ont été synthétisés sur la base de leurs ligands putatifs présentés dans la littérature. Cependant, nous n'avons pas observé d'interactions significatives avec ces glycoclusters, empêchant donc de réaliser le criblage vis-à-vis de ces lectines. Enfin, pour compléter cette méthode de criblage, il serait intéressant de développer une méthode d'analyse automatique des résultats, en s'inspirant des logiciels bioinformatiques analysant des données issues de glycoarrays.

Dans un dernier temps, le glycocluster-microarray a été utilisé pour cribler une bibliothèque de glycoclusters ciblant les sept lectines étudiées pendant cette thèse. L'interaction multivalente permet d'exalter l'interaction lectine/sucre, c'est le cluster glycoside effect. Il est donc espéré exalter l'interaction par l'utilisation de glycoclusters par rapport aux glycosides. Le criblage de la bibliothèque de glycoclusters, complété par de la modélisation moléculaire et les résultats présents dans la littérature, a permis une compréhension fine des relations structure-affinité des glycoclusters ciblant les lectines PA-IL et PA-IIL. Pour cela, des glycoclusters possédant différents motifs saccharidiques, topologies, valences et propriétés ont été étudiés.

Le criblage vis-à-vis de PA-IL a montré que la présence d'un aglycone aromatique sur les bras des glycoclusters présentant du galactose favorisait grandement l'interaction. L'optimisation de cet aglycone a montré que plus la densité électronique de l'aromatique était élevée plus l'interaction avec PA-IL était favorable. La modélisation moléculaire des galactosides aromatiques et des galactoclusters a montré que tous les cycles aromatiques permettaient la création d'interactions supplémentaires type π-stacking avec les résidus aromatiques de PA-IL (His50, Pro51 et Pro38). La majorité des cycles aromatiques adoptent la conformation T-shaped. La modélisation a aussi montré que la présence d'une charge négative au voisinage du cycle aromatique permet la création d'une interaction hydrogène supplémentaire avec l'His50 ou l'Asn107 de PA-IL. Les meilleurs des galactoclusters sont Man(EG_3MTzAcNPh-Gal)$_4$, Man(EG_2MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$ et le Man(EG_2MTzproNOCNapht-Gal)$_4$ et Man(EG_3MTzAcTyr-Gal)$_4$ avec des K_d autours de 20 nM. Un effet chélate a été observé grâce à l'évaluation ITC du galactocluster G2,

Man(proTzAcNPh)$_4$ où deux galactoses d'un même galactocluster sont pressentit pour interagir avec deux sites du bord court d'un même tétramère de PA-IL.
Néanmoins, l'optimisation de l'aglycone aromatique n'a pas permis de passer des affinités du nM au pM. Il serait donc intéressant de travailler sur la topologie du galactocluster pour espérer augmenter l'effet chélate et permettre l'interaction simultanée avec les quatre sites présents sur un tétramère de PA-IL. De plus, il serait intéressant de tester des galactoclusters possédant des bras supplémentaires sans galactose mais pouvant faire des connexions avec des résidus proches du site de reconnaissance de PA-IL afin de renforcer l'interaction.

En ce qui concerne la lectine PA-IIL, il a été montré que le paramètre clé permettant une forte affinité est le motif saccharidique présenté par les glycoclusters. Les meilleurs des motifs saccharidiques sont le Lewis^A et le 3-FL. La présentation multivalente de ceux-ci a toujours permis un gain d'affinité par rapport au monovalent. Différentes topologies tétravalentes et trivalentes ont été testées. Bien que les différences d'affinité ne soient pas grandes, une préférence pour les glycoclusters tétravalents à cœur galactose a été obtenue. Néanmoins, ce gain d'affinité n'a pas pu être attribué à un effet chélate mais plutôt à une augmentation locale de la concentration en motif saccharidique. Les meilleurs des glycoclusters testés sur microarray sont le Gal(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$ et le Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude avec d'autres topologies de glycoclusters afin d'obtenir un effet chélate et renforcer d'autant l'interaction avec PA-IIL.

Le criblage sur microarray des glycoclusters présentant les ligands potentiels des lectines du flagelle (FliC, FliD) et des *pili* (PilA, PilY1, CupB6) de PA, n'a pas permis de mettre en évidence une interaction spécifique. Du fait que ces lectines soient présentes sur des organelles de la bactérie (flagelle, *pili*), leur production en hétérologue et en solution pourrait affecter leur activité. De plus, une analyse sur gels d'électrophorèse des lectines PilA et FliD a montré que leur marquage à l'Alexa647 semblait affecter tout du moins leur structure quaternaire. Pour pallier à cela, il a été envisagé d'utiliser des extraits de *pili* et flagelles directement issus de PA et des anticorps permettant une détection indirecte de l'interaction sans marquer au préalable les lectines/extraits. Des premiers tests ont été effectués avec l'anticorps anti-FliD. Ils n'ont pas non plus permis de détecter d'interactions avec les glycoclusters. Cependant, il a été testé un extrait de flagelles constitué majoritairement de FliC. Ainsi qu'une lectine FliD de la souche PAO1 produite en hétérologue et dont le ligand putatif n'a pas été identifié. Des anticorps anti-PilA et anti-FliC sont en cours de production.

Un bel espoir est donc porté sur leur utilisation pour la détection d'interaction avec les glycoclusters. D'autres voies pourraient également être explorées comme l'utilisation de bactéries entières adsorbées sur le microarray et mutées pour l'expression soit de FliC soit de PilA ou encore l'utilisation de l'imagerie SPR qui permettrait une détection en temps réel et sans marquage de l'interaction glycocluster/lectine.

Des tests *in vitro* ont montré que les galactoclusters Man(proTzAcNPh)$_4$ et Man(EG$_2$MTzAcNPh)$_4$ ciblant PA-IL sont capables de déstabiliser le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce qui confirme d'une part que PA-IL est une bonne cible pour combattre PA et que, d'autre part, nos galactoclusters possèdent une affinité suffisamment grande pour PA-IL pour avoir une activité anti-biofilm. Il serait intéressant de poursuivre avec une étude *in vivo* comme chez un modèle murin de mucoviscidose. Il serait également judicieux d'investiguer l'effet des glycoclusters ciblant PA-IIL, les lectines du flagelle et celles des *pili* sur le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G., Schumacher, U., **1997**. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155*, 2102–2104.

Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I., Prince, A., **2004**. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 30*, 627–634.

Aim, R., Hallinan, J., Watson, A., Mattick, J., **1996**. *Mol. Microbiol. 22*, 161–173.

Almant, M., Moreau, V., Kovensky, J., Bouckaert, J., Gouin, S.G., **2011**. *Chem. Eur. J. 17*, 10029–10038.

Andreini, M., Anderluh, M., Audfray, A., Bernardi, A., Imberty, A., **2010**. *Carbohydr. Res. 345*, 1400–1407.

Angeloni, S., Ridet, J.L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H., Sprenger, N., **2005**. *Glycobiology 15*, 31–41.

Arora, S.K., Dasgupta, N., Lory, S., Ramphal, R., **2000**. *Infect. Immun. 68*, 1474–1479.

Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R., **1998**. *Infect. Immun. 66*, 1000–1007.

Ashwell, G., Harford, J., **1982**. *Annu. Rev. Biochem. 51*, 531–554.

Ashwell, G., Morell, A.G., **1974**. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 41*, 99–128.

Azghani, A.O., **1996**. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15*, 132–140.

Baek, M.-G., Roy, R., **2002**. *Bioorg. Med. Chem. 10*, 11–17.

Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M., Høiby, N., **2004**. *Antimicrob. Agents Chemother. 48*, 1168–1174.

Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J.M., Madoulet, C., Plotkowski, M.C., Chippaux, C., Puchelle, E., **1994**. *Infect. Immun. 62*, 4481–4487.

Balasubramanian, D., Kong, K.F., Jayawardena, S.R., Leal, S.M., Sautter, R.T., Mathee, K., **2011**. *J. Med. Microbiol. 60*, 147–156.

Bardy, S.L., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F., **2003**. *Microbiology 149*, 295–304.

Barrientos, Á.G., de la Fuente, J.M., Rojas, T.C., Fernández, A., Penadés, S., **2003**. *Chem. Eur. J. 9*, 1909–1921.

Bergmann, M., Michaud, G., Visini, R., Jin, X., Gillon, E., Stocker, A., Imberty, A., Darbre, T., Reymond, J.-L., **2016**. *Org. Biomol. Chem. 14*, 138–148.

Berthet, N., Thomas, B., Bossu, I., Dufour, E., Gillon, E., Garcia, J., Spinelli, N., Imberty, A., Dumy, P., Renaudet, O., **2013**. *Bioconjugate. Chem. 24*, 1598–1611.

Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Burmølle, M., Hentzer, M., Haagensen, J.A.J., Hougen, H.P., Calum, H., Madsen, K.G., Moser, C., Molin, S., Høiby, N., Givskov, M., **2005**. *Microbiology 151*, 373–383.

Blanchard, A.P., Hood, L., **1996**. *Nature Biotechnoogy 14*, 1649–1649.

Blanchard, B., Imberty, A., Varrot, A., **2014**. *Proteins 82*, 1060–1065.

Blanchard, B., Nurisso, A., Hollville, E., Tétaud, C., Wiels, J., Pokorná, M., Wimmerová, M., Varrot, A., Imberty, A., **2008**. *J. Mol. Biol. 383*, 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. USA 101*, 17033–17038.

de Boer, A.R., Hokke, C.H., Deelder, A.M., Wuhrer, M., **2008**. *Glycoconj. J. 25*, 75–84.

Boukerb, A.M., Rousset, A., Galanos, N., Méar, J.-B., Thépaut, M., Grandjean, T., Gillon, E., Cecioni, S., Abderrahmen, C., Faure, K., Redelberger, D., Kipnis, E., Dessein, R., Havet, S., Darblade, B., Matthews, S.E., de Bentzmann, S., Guéry, B., Cournoyer, B., Imberty, A., Vidal, S., **2014**. *J. Med. Chem. 57*, 10275–10289.

Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., Karplus, M., **1983**. *J. Comput. Chem. 4*, 187–217.

Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P., Prince, A., **1998**. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 19*, 269–277.

Bucior, I., Pielage, J.F., Engel, J.N., **2012**. *PLoS Pathog. 8*, 1-18.

Buffet, K., Gillon, E., Holler, M., Nierengarten, J.-F., Imberty, A., Vincent, S.P., **2015**. *Org. Biomol. Chem. 13*, 6482–6492.

Cai, X., Wang, R., Filloux, A., Waksman, G., Meng, G., **2011**. *PLoS ONE 6*, 1-8.

Cairo, C.W., Gestwicki, J.E., Kanai, M., Kiessling, L.L., **2002**. *J. Am. Chem. Soc. 124*, 1615–1619.

Carver, F.J., Hunter, C.A., Jones, P.S., Livingstone, D.J., McCabe, J.F., Seward, E.M., Tiger, P., Spey, S.E., **2001**. *Chem. Eur. J. 7*, 4854–4862.

Casoni, F., Dupin, L., Vergoten, G., Meyer, A., Ligeour, C., Géhin, T., Vidal, O., Souteyrand, E., Vasseur, J.-J., Chevolot, Y., Morvan, F., **2014**. *Org. Biomol. Chem. 12*, 9166–9179.

Caumes, C., Gillon, E., Legeret, B., Taillefumier, C., Imberty, A., Faure, S., **2015**. *Chem. Commun. 51*, 12301–12304.

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

2159.

Cecioni, S., Imberty, A., Vidal, S., **2015**. *Chem. Rev.* 115, 525–561.

Cecioni, S., Lalor, R., Blanchard, B., Praly, J.-P., Imberty, A., Matthews, S.E., Vidal, S., **2009**. *Chem. Eur. J. 15*, 13232–13240.

Cecioni, S., Oerthel, V., Iehl, J., Holler, M., Goyard, D., Praly, J.P., Imberty, A., Nierengarten, J.-F., Vidal, S., **2011b**. *Chem. Eur. J. 17*, 3252–3261.

Cecioni, S., Praly, J.P., Matthews, S.E., Wimmerová, M., Imberty, A., Vidal, S., **2012**. *Chem. Eur. J. 18*, 6250–6263.

Chabre, Y.M., Giguère, D., Blanchard, B., Rodrigue, J., Rocheleau, S., Neault, M., Rauthu, S., Papadopoulos, A., Arnold, A.A., Imberty, A., Roy, R., **2011**. *Chem. Eur. J. 17*, 6545–6562.

Chabre, Y.M., Roy, R., **2010**. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 33*, 165–393.

Chang, S.H., Han, J.L., Tseng, S.Y., Lee, H.Y., Lin, C.W., Lin, Y.C., Jeng, W.Y., Wang, A.H.J., Wu, C.Y., Wong, C.H., **2010**. *J. Am. Chem. Soc. 132*, 13371–13380.

Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B.P., Faure, K., **2009**. *Infect. Immun. 77*, 2065–2075.

Chen, C.P., Song, S.C., Gilboa-Garber, N., Chang, K.S.S., Wu, A.M., **1998**. *Glycobiology 8*, 7–16.

Chen, G.S., Pohl, N.L., **2008**. *Org. Lett. 10*, 785–788.

Cheng, Y., Prusoff, W.H., **1973**. *Biochem. Pharmacol. 22*, 3099–3108.

Chevance, F.F. V., Hughes, K.T., **2008**. *Nature Rev. Microbiol. 6*, 455–465.

Chevolot, 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. 46*, 2398–2402.

Chevolot, Y., Laurenceau, E., Souteyrand, E., **2007b**. *ITBM-RBM 28*, 194–209.

Chevolot, Y., Zhang, J., Meyer, A., Goudot, A., Rouanet, S., Vidal, S., Pourceau, G., Cloarec, J.P., Praly, J.P., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Morvan, F., **2011**. *Chem. Commun. 47*, 8826–8828.

Chiang, W.C., Nilsson, M., Jensen, P.O., Hoiby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., **2013**. *Antimicrob. Agents Chemother. 57*, 2352–2361.

Cioci, G., Mitchell, E.P., Gautier, C., Wimmerová, M., Sudakevitz, D., Pérez, S., Gilboa-Garber, N., Imberty, A., **2003**. *FEBS Lett. 555*, 297–301.

Clark, M., Cramer, R.D., Van Opdenbosch, N., **1989**. *J. Comput. Chem.* 10, 982–1012.

Cloninger, M.J., **2002**. *Curr. Opin. Chem. Biol. 6*, 742–748.

Colomb, F., Vidal, O., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A.,

Mensier, E., Jaillard, S., Lafitte, J.J., Delannoy, P., Groux-Degroote, S., **2014**. *Biochem. J. 457*, 79–87.

Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., **1995**. *J. Am. Chem. Soc. 117*, 5179–5197.

Dam, T.K., Brewer, C.F., **2002**. *Chem. Rev. 102*, 387–430.

Darbre, T., Reymond, J.L., **2008**. *Curr. Top. Med. Chem. 8*, 1286–1293.

Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., **2003**. *J. Bacteriol. 185*, 1027–1036.

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

Deniaud, D., Julienne, K., Gouin, S.G., **2011**. *Org. Biomol. Chem. 9*, 966–979.

DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y.A., Trent, J.M., **1996**. *Nature Genet. 14*, 457–460.

Derreumaux, P., Vergoten, G., **1995**. *J. Chem. Phys. 102*, 8586–8605.

Dhayal, M., Ratner, D.A., **2009**. *Langmuir 25*, 2181–2187.

DiMango, E., Zar, H.J., Bryan, R., Prince, A., **1995**. *J. Clin. Invest. 96*, 2204–2210.

Ding, L., Cheng, W., Wang, X., Ding, S., Ju, H., **2008**. *J. Am. Chem. Soc. 130*, 7224–7225.

Disney, M.D., Seeberger, P.H., **2004**. *Chem. Biol. 11*, 1701–1707.

Dugas, V., Depret, G., Chevalier, Y., Nesme, X., Souteyrand, E., **2004**. *Sens. Actuat. B-Chem 101*, 112–121.

Dupin, L., Zuttion, F., Géhin, T., Meyer, A., Phaner-Goutorbe, M., Vasseur, J.J., Souteyrand, E., Morvan, F., Chevolot, Y., **2015**. *ChemBioChem 16*, 2329–2336.

Emam, A., Yu, A.R., Park, H.J., Mahfoud, R., Kus, J., Burrows, L.L., Lingwood, C.A., **2006**. *Microbiology 152*, 2789–2799.

Ernst, B., Magnani, J.L., **2009**. *Nature. Rev. Drug Discov. 8*, 661–677.

Feizi, T., Fazio, F., Chai, W., Wong, C.H., **2003**. *Curr. Opin. Struct. Biol. 13*, 637–645.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A., **1998**. *Infect. Immun. 66*, 43–51.

Flemming, H.C., Wingender, J., **2010**. *Nature. Rev. Microbiol. 8*, 623–633.

Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., Lynne Howell, P., **2011**. *Front. Microbiol. 2*, 1–16.

Freire, E., Obdulio, L., Straume, M., **1990**. *Anal. Chem. 62*, 950–959.

Fry, S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R., Aitken, J., **1993**. *Plant Physiol. 103*, 1–5.

Fukui, S., Feizi, T., Galustian, C., Lawson, A.M., Chai, W., **2002**. *Nature Biotechnol. 20*, 1011–1017.

Galanina, O.E., Mecklenburg, M., Nifantiev, N.E., Pazynina, G. V, Bovin, N. V, **2003**. *Lab Chip 3*, 260–265.

Garber, N., Guempel, U., Belz, A., Gilboa-Garber, N., Doyle, R.J., **1992**. *Biochim. Biophys. Acta 1116*, 331–333.

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

Gellatly, S.L., Hancock, R.E.W., **2013**. *Pathog. Dis. 67*, 159–173.

Gendler, S.J., **2001**. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 6*, 339–353.

Gening, M.L., Titov, D. V., Cecioni, S., Audfray, A., Gerbst, A.G., Tsvetkov, Y.E., Krylov, V.B., Imberty, A., Nifantiev, N.E., Vidal, S., **2013**. *Chem. Eur. J. 19*, 9272–9285.

Gerland, B., Goudot, A., Ligeour, C., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Gehin, T., Vidal, O., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Chevolot, Y., Morvan, F., **2014**. *Bioconjugate Chem. 25*, 379–392.

Gerland, B., Goudot, A., Pourceau, G., Meyer, A., Dugas, V., Cecioni, S., Vidal, S., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Chevolot, Y., Morvan, F., **2012**. *Bioconjugate Chem. 23*, 1534–1547.

Gestwicki, J.E., Cairo, C.W., Strong, L.E., Oetjen, K.A., Kiessling, L.L., **2002**. *J. Am. Chem. Soc. 124*, 14922–14933.

Gianvincenzo, P. Di, Calvo, J., Perez, S., Álvarez, A., Bedoya, L.M., Alcamí, J., Penadés, S., **2015**. *Bioconjugate Chem. 26*, 755–765.

Gibson, R.L., Burns, J.L., Ramsey, B.W., **2003**. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 918–951.

Gilboa-Garber, N., **1982**. *Methods Enzymol. 83*, 378–385.

Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L., Garber, N., **1972**. *FEBS Lett. 28*, 93–95.

Gilboa-Garber, N., Sudakevitz, D., Sheffi, M., Sela, R., Levene, C., **1994**. *Glycoconj. J. 11*, 414–417.

Glick, J., Garber, N., **1983**. *J. Gen. Microbiol. 129*, 3085–3090.

Godula, K., Bertozzi, C.R., **2010**. *J. Am. Chem. Soc. 132*, 9963–9965.

Godula, K., Bertozzi, C.R., **2012**. *J. Am. Chem. Soc. 134*, 15732–15742.

Godula, K., Rabuka, D., Nam, K.T., Bertozzi, C.R., **2009**. *Angew. Chem. Int. Ed. 48*, 4973–4976.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N., **1980**. *Nature 285*, 66.

Goudot, A., Pourceau, G., Meyer, A., Gehin, T., Vidal, S., Vasseur, J.J., Morvan, F., Souteyrand, E., Chevolot, Y., **2013**. *Biosens. Bioelectron. 40*, 153–160.

Gouin, S.G., Wellens, A., Bouckaert, J., Kovensky, J., **2009**. *ChemMedChem 4*, 749–755.

Grishin, A., Karyagina, A.S., Tiganova, I.G., Dobrynina, O.Y., Bolshakova, T.N., Boksha, I.S., Alexeyeva, N. V., Stepanova, T. V., Lunin, V.G., Chuchalin, A.G., Ginzburg, A.L., **2013**. *Int. J. Antimicrob. Agents 42*, 471–472.

Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., Drickamer, K., **2004**. *Nature Struct. Mol. Biol. 11*, 591–598.

Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinick, S., Hazlett, L.D., 1994. *Infect. Immun. 62*, 4572–4579.

Hahn, H.P., **1997**. *Gene 192*, 99–108.

Halperin, A., Buhot, A., Zhulina, E.B., **2004**. *Biophys. J. 86*, 718–730.

Harvey, H., Habash, M., Aidoo, F., Burrows, L.L., **2009**. *J. Bacteriol. 191*, 6513–6524.

Hauber, H.P., Schulz, M., Pforte, A., Mack, D., Zabel, P., Schumacher, U., **2008**. *Int. J. Med. Sci. 5*, 371–376.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., **2001**. *Nature 410*, 1099–1103.

Hazes, B., Sastry, P.A., Hayakawa, K., Read, R.J., Irvin, R.T., **2000**. *J. Mol. Biol. 299*, 1005–1017.

Heimburg-Molinaro, J., Tappert, M., Song, X., Lasanajak, Y., Air, G., Smith, D.F., Cummings, R.D., **2012**. *Methods Mol. Biol.* 251–267.

Heiniger, R.W., Winther-Larsen, H.C., Pickles, R.J., Koomey, M., Wolfgang, M.C., **2010**. *Cell. Microbiol. 12*, 1158–1173.

Hirst, G.K., **1941**. *Science 94*, 22–23.

Hirst, G.K., **1942**. *J. Exp. Med. 75*, 49–64.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., **2010**. *Int. J. Antimicrob. Agents 35*, 322–332.

Horan, N., Yan, L., Isobe, H., Whitesides, G.M., Kahne, D., **1999**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96*, 11782–11786.

Houseman, B.T., Mrksich, M., **1999**. *Angew. Chem. Int. Ed. 38*, 782–785.

Houseman, B.T., Mrksich, M., **2002**. *Chem. Biol. 9*, 443–454.

Hsiao, H.Y., Chen, M.L., Wu, H.T., Huang, L.D., Chien, W.T., Yu, C.C., Jan, F.D., Sahabuddin, S., Chang, T.C., Lin, C.C., **2011**. *Chem. Commun. 47*, 1187–1189.

Huang, C.-Y., Thayer, D.A., Chang, A.Y., Best, M.D., Hoffmann, J., Head, S., Wong, C.H., **2006**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103*, 15–20.

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

Ikeda, T., Oosawa, K., Hotani, H., **1996**. *J. Mol. Biol. 259*, 679–686.

Imberty, A., Chabre, Y.M., Roy, R., **2008**. *Chem. Eur. J. 14*, 7490–7499.

Imberty, A., Wimmerová, M., Mitchell, E.P., Gilboa-Garber, N., **2004**. *Microbes Infect. 6*, 221–228.

Jefferson, K.K., Goldmann, D.A., Pier, G.B., **2005**. *Antimicrob. Agents Chemother. 49*, 2467–2473.

Jencks, W.P., **1981**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*, 4046–4050.

Jensen, P.O., Givskov, M., Bjarnsholt, T., Moser, C., **2010**. *FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59*, 292–305.

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*, 1249–1257.

Johansson, E.M. V, Kadam, R.U., Rispoli, G., Crusz, S.A., Bartels, K.M., Diggle, S.P., Cámara, M., Williams, P., Jaeger, K.E., Darbre, T., Reymond, J.L., **2011**. *Med. Chem. Commun. 2*, 418–420.

Kadam, R.U., Bergmann, M., Garg, D., Gabrieli, G., Stocker, A., Darbre, T., Reymond, J.L., **2013a**. *Chem. Eur. J. 19*, 17054–17063.

Kadam, R.U., Bergmann, M., Hurley, M., Garg, D., Cacciarini, M., Swiderska, M.A., Nativi, C., Sattler, M., Smyth, A.R., Williams, P., Cámara, M., Stocker, A., Darbre, T., Reymond, J.L., **2011**. *Angew. Chem. Int. Ed. 50*, 10631–10635.

Kadam, R.U., Garg, D., Schwartz, J., Visini, R., Sattler, M., Stocker, A., Darbre, T., Reymond, J.L., **2013b**. *ACS Chem. Biol. 8*, 1925–1930.

Kane, R.S., **2010**. *Langmuir 26*, 8636–8640.

Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C., **1989**. *Science 245*, 1073–1080.

Khanal, M., Larsonneur, F., Raks, V., Barras, A., Baumann, J.S., Martin, F.A., Boukherroub, R., Ghigo, J.M., Ortiz Mellet, C., Zaitsev, V., Garcia Fernandez, J.M., Beloin, C., Siriwardena, A., Szunerits, S., **2015**. *Nanoscale 7*, 2325–2335.

Kiessling, L.L., Gestwicki, J.E., Strong, L.E., **2000**. *Curr. Opin. Chem. Biol. 4*, 696–703.

Kiessling, L.L., Gestwicki, J.E., Strong, L.E., **2006**. *Angew. Chem. Int. Ed. 45*, 2348–2368.

Kirkeby, S., Moe, D., **2005**. *Curr. Microbiol. 50*, 309–313.

Kitov, P.I., Bundle, D.R., **2003**. *J. Am. Chem. Soc. 125*, 16271–16284.

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

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., **2003**. *Mol. Microbiol. 48*, 1511–1524.

Kletter, D., Cao, Z., Bern, M., Haab, B., **2013a**. *Curr. Protoc. Chem. Biol. 5*, 157–169.

Kletter, D., Singh, S., Bern, M., Haab, B.B., **2013b**. *Mol. Cell. Proteomics 12*, 1026–1035.

Ko, K.S., Jaipuri, F.A., Pohl, N.L., **2005**. *J. Am. Chem. Soc. 127*, 13162–13163.

Kolomiets, E., Swiderska, M.A., Kadam, R.U., Johansson, E.M. V, Jaeger, K.E., Darbre, T., Reymond, J.L., **2009**. *ChemMedChem 4*, 562–569.

Konig, B., Fricke, T., Wassmann, A., Krallmannwenzel, U., Lindhorst, T.K., **1998**. *Tetrahedron Lett. 39*, 2307–2310.

Krishnamurthy, V.M., Estroff, L.A., Whitesides, G.M., **2006**. *Methods Princ. Med. Chem. 34*, 11–53.

Kuno, A., Uchiyama, N., Koseki-Kuno, S., Ebe, Y., Takashima, S., Yamada, M., Hirabayashi, J., **2005**. *Nature Methods 2*, 851–856.

Kunzelmann, K., Scheidt, K., Scharf, B., Ousingsawat, J., Schreiber, R., Wainwright, B., McMorran, B., **2006**. *FASEB J. 20*, 545–546.

de La Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Cañada, J., Fernández, A., Penadés, S., **2001**. *Angew. Chem. Int. Ed. 40*, 2257–2261.

de La Fuente, J.M., Penadés, S., **2006**. *Biochim. Biophys. Acta 1760*, 636–651.

Lagant, P., Nolde, D., Stote, R., Vergoten, G., Karplus, M., **2004**. *J. Phys. Chem.* A *108*, 4019–4029.

Lakowicz, J.R., **2006**. *Princ. Fluoresc. Spectrosc.*, 3rd Ed.

Lallemand, D., Rouillat, M.H., Dugas, V., Chevolot, Y., Souteyrand, E., Phaner-Goutorbe, M., **2007**. *J. Phys. Conf. Ser. 61*, 658–662.

Lanne, B., Cîopraga, J., Bergström, J., Motas, C., Karlsson, K.A., **1994**. *Glycoconj. J. 11*, 292–298.

Lee, M. ryul, Shin, I., **2005**. *Angew. Chem. Int. Ed. 44*, 2881–2884.

Lee, Y.C., Lee, R.T., **1995**. *Acc. Chem. Res. 28*, 321–327.

Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., Jeffers, A.K., **2005**. *J. Immunol. 175*, 7512–7518.

Liang, C.H., Wang, S.K., Lin, C.W., Wang, C.C., Wong, C.H., Wu, C.Y., **2011**. *Angew. Chem. Int. Ed. 50*, 1608–1612.

Liang, P.H., Imamura, M., Li, X., Wu, D., Fujio, M., Guy, R.T., Wu, B.C., Tsuji, M., Wong, C.H., **2008**. *J. Am. Chem. Soc. 130*, 12348–12354.

Liang, P.H., Wang, S.K., Wong, C.H., **2007**. *J. Am. Chem. Soc. 129*, 11177–11184.

Liang, R., Loebach, J., Horan, N., Ge, M., Thompson, C., Yan, L., Kahne, D., **1997**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94*, 10554–10559.

Liang, R., Yan, L., Loebach, J., Ge, M., Uozumi, Y., Sekanina, K., Horan, N., Gildersleeve, J., Thompson, C., Smith, A., Biswas, K., Still, W.C., Kahne, D., **1996**. *Science 274*, 1520–1522.

Liebeschuetz, J.W., Cole, J.C., Korb, O., 2012. J. Comput. Aided. Mol. Des. *26*, 737–748.

Liedberg, B., Nylander, C., Lunström, I., **1983**. *Sensors and Actuators 4*, 299–304.

Ligeour, C., Dupin, L., Angeli, A., Vergoten, G., Vidal, S., Meyer, A., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Chevolot, Y., Morvan, F., **2015a**. *Org. Biomol. Chem. 13*, 11244–11254.

Ligeour, C., Dupin, L., Marra, A., Vergoten, G., Meyer, A., Dondoni, A., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Chevolot, Y., Morvan, F., **2014**. *Eur. J. Org. Chem.*, 7621–7630.

Ligeour, C., Vidal, O., Dupin, L., Casoni, F., Gillon, E., Meyer, A., Vidal, S., Vergoten, G., Lacroix, J.M., Souteyrand, E., Imberty, A., Vasseur, J.J., Chevolot, Y., Morvan, F., **2015b**. *Org. Biomol. Chem. 13*, 8433–8444.

Lillehoj, E.P., Kim, B.T., Kim, K.C., **2002**. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 282*, 751–756.

Loris, R., Tielker, D., Jaeger, K.E., Wyns, L., **2003**. *J. Mol. Biol. 331*, 861–870.

Lundquist, J.J., Toone, E.J., **2002**. *Chem. Rev. 102*, 555–578.

MacKerell, A.D.J., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M., **1998**. *J. Phys. Chem. B 102*, 3586–616.

Mammen, M., Choi, S.-K., Whitesides, G.M., 1998. Angew. Chem. Int. Ed. 37, 2754–2794.

Marotte, K., Eville, C.P., Sabin, C., Pymbock, M.M., Imberty, A., Roy, R., **2007a**. *Org. Biomol. Chem. 5*, 2953–2961.

Marotte, K., Sabin, C., Preville, C., Moume-Pymbock, M., Wimmerova, M., Mitchell, E.P., Imberty, A., Roy, R., **2007b**. *ChemMedChem 2*, 1328–1338.

Marra, A., Moni, L., Pazzi, D., Corallini, A., Bridi, D., Dondoni, A., **2008**. *Org. Biomol. Chem. 6*, 1396–1409.

Marradi, M., Chiodo, F., García, I., Penadés, S., **2013**. *Chem. Soc. Rev. 42*, 4728–4745.

Marras, S.A.E., Kramer, F.R., Tyagi, S., **2002**. *Nucl. Acids Res. 30*, 1-8.

Meyer, E.A., Castellano, R.K., Diederich, F., **2003**. *Angew. Chem. Int. Ed. 42*, 1210–1250.

Michel, O., Ravoo, B.J., **2008**. *Langmuir 24*, 12116–12118.

Mirzabekov, A.D., **1994**. *Trends Biotechnol. 12*, 27–32.

Mitchell, E., Houles, C., Sudakevitz, D., Wimmerova, M., Gautier, C., Perez, S., Wu, A.M.,

Gilboa-Garber, N., Imberty, A., **2002**. *Nature Struct. Biol. 9*, 918–921.

Miura, Y., **2012**. *Polym. J. 44*, 679–689.

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

Morvan, F., Vidal, S., Souteyrand, E., Chevolot, Y., Vasseur, J.J., **2012**. *RSC Adv. 2*, 12043–12068.

Müller, C., Despras, G., Lindhorst, T.K., **2016**. *Chem. Soc. Rev. 45*, 3275–3302.

Narla, S.N., Sun, X.L., **2012**. *Lab Chip 12*, 1656–1663.

Nguyen, Y., Jackson, S.G., Aidoo, F., Junop, M., Burrows, L.L., **2010**. *J. Mol. Biol. 395*, 491–503.

Niemeyer, C.M., Boldt, L., Ceyhan, B., Blohm, D., **1999**. *Anal. Biochem. 268*, 54–63.

Nierengarten, I., Buffet, K., Holler, M., Vincent, S.P., Nierengarten, J.F., **2013**. *Tetrahedron Lett. 54*, 2398–2402.

Novoa, A., Eierhoff, T., Topin, J., Varrot, A., Barluenga, S., Imberty, A., Römer, W., Winssinger, N., **2014**. *Angew. Chem. Int. Ed. 53*, 8885–8889.

Nurisso, A., Blanchard, B., Audfray, A., Rydner, L., Oscarson, S., Varrot, A., Imberty, A., **2010**. *J. Biol. Chem. 285*, 20316–20327.

O'Toole, G.A., Kolter, R., **1998**. *Mol. Microbiol. 30*, 295–304.

Orans, J., Johnson, M.D.L., Coggan, K.A., Sperlazza, J.R., Heiniger, R.W., Wolfgang, M.C., Redinbo, M.R., **2010**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107*, 1065–1070.

Oyelaran, O., Li, Q., Farnsworth, D., Gildersleeve, J.C., **2009**. *J. Proteome Res. 8*, 3529–3538.

Papalia, G.A., Leavitt, S., Bynum, M.A., Katsamba, P.S., Wilton, R., Qiu, H., Steukers, M., Wang, S., Bindu, L., Phogat, S., Giannetti, A.M., Ryan, T.E., Pudlak, V. a., Matusiewicz, K., Michelson, K.M., Nowakowski, A., Pham-Baginski, A., Brooks, J., Tieman, B.C., Bruce, B.D., Vaughn, M., Baksh, M., Cho, Y.H., Wit, M. De, Smets, A., Vandersmissen, J., Michiels, L., Myszka, D.G., **2006**. *Anal. Biochem. 359*, 94–105.

Park, S., Gildersleeve, J.C., Blixt, O., Shin, I., **2013**. *Chem. Soc. Rev. 42*, 4310–4326.

Park, S., Lee, M.R., Pyo, S.J., Shin, I., **2004**. *J. Am. Chem. Soc. 126*, 4812–4819.

Park, S., Lee, M.-R., Shin, I., **2007**. *Nature Protoc. 2*, 2747–2758.

Park, S., Shin, I., **2002**. *Angew. Chem. Int. Ed. 41*, 3180–3182.

Park, S., Shin, I., **2007**. *Org. Lett. 9*, 1675–1678.

Pavlovskis, O.R., Iglewski, B.H., Pollack, M., **1978**. *Infect. Immun. 19*, 29–33.

Pedersen, H.L., Fangel, J.U., McCleary, B., Ruzanski, C., Rydahl, M.G., Ralet, M.C., Farkas,

V., Von Schantz, L., Marcus, S.E., Andersen, M.C.F., Field, R., Ohlin, M., Knox, J.P., Clausen, M.H., Willats, W.G.T., **2012**. *J. Biol. Chem. 287*, 39429–39438.

Pei, Z., Yu, H., Theurer, M., Waldén, A., Nilsson, P., Yan, M., Ramström, O., **2007**. *ChemBioChem 8*, 166–168.

Perret, S., Sabin, C., Dumon, C., Pokorná, M., Gautier, C., Galanina, O., Ilia, S., Bovin, N., Nicaise, M., Desmadril, M., Gilboa-Garber, N., Wimmerov´, M., Mitchell, E.P., Imberty, A., **2005**. *Biochem. J. 389*, 325–332.

Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., Gitai, Z., **2015**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112*, 7563–7568.

Pertici, F., de Mol, N.J., Kemmink, J., Pieters, R.J., **2013**. *Chem. Eur. J. 19*, 16923–16927.

Phaner-Goutorbe, M., Dugas, V., Chevolot, Y., Souteyrand, E., **2011**. *Mater. Sci. Eng. C 31*, 384–390.

Pier, G.B., **2003**. *Carbohydr. Res. 338*, 2549–2556.

Pier, G.B., **2007**. *Int. J. Med. Microbiol. 297*, 277–295.

Pourceau, G., Meyer, A., Chevolot, Y., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Morvan, F., **2010**. *Bioconjugate Chem. 21*, 1520–1529.

Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J.J., Morvan, F., **2008**. *J. Org. Chem. 73*, 6014–6017.

Rehm, B.H.A., **2008**. *Pseudomonas Model Org. Pathog. Cell Fact.* 1–402.

Renaud, L., Selloum, D., Tingry, S., **2015**. *Microfluid. Nanofluidics 18*, 1407–1416.

Renaudet, O., Roy, R., **2013**. *Chem. Soc. Rev.* 4515–4517.

Reymond, J.L., Bergmann, M., Darbre, T., **2013**. *Chem. Soc. Rev. 42*, 4814–4822.

Reynolds, M., Marradi, M., Imberty, A., Penad, S., Perez, S., **2012**. *Chem. Eur. J. 18*, 4264 – 4273.

Reynolds, M., Perez, S., **2010**. *Compte Rendu Chim.* 1–22.

Rodrigue, J., Ganne, G., Blanchard, B., Saucier, C., Giguère, D., Shiao, T.C., Varrot, A., Imberty, A., Roy, R., **2013**. *Org. Biomol. Chem. 11*, 6906–6918.

Rogers, C.J., Clark, P.M., Tully, S.E., Abrol, R., Garcia, K.C., Goddard, W.A., Hsieh-Wilson, L.C., **2011**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108*, 9747–9752.

Rojo, J., Díaz, V., De La Fuente, J.M., Segura, I., Barrientos, A.G., Riese, H.H., Bernad, A., Penadés, S., **2004**. *ChemBioChem 5*, 291–297.

Roy, R., **1996**. *Curr. Opin. Struct. Biol. 6*, 692–702.

Ruer, S., Stender, S., Filloux, A., De Bentzmann, S., **2007**. *J. Bacteriol. 189*, 3547–3555.

Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D.J., **2007**. *Curr. Opin. Microbiol. 10*, 644–648.

Sabesan, S., Domaille, P., Kelm, S., Paulson, J.C., Bock, K., **1992**. *J. Am. Chem. Soc. 114*,

8363–8375.

Saiman, L., Prince, A., **1993**. *J. Clin. Invest. 92*, 1875–1880.

Sakuragi, Y., Kolter, R., **2007**. *J. Bacteriol. 189*, 5383–5386.

Sanchez-Ruiz, A., Serna, S., Ruiz, N., Martin-Lomas, M., Reichardt, N.-C., **2011**. *Angew. Chem. Int. Ed. 50*, 1801–1804.

Schallus, T., Jaeckh, C., Feher, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feizi, T., Pieler, T., Muhle-Goll, C., **2008**. *Mol. Biol. Cell 19*, 3404–3414.

Scharfman, A., Arora, S.K., Delmotte, P., Van Brussel, E., Mazurier, J., Ramphal, R., Roussel, P., **2001**. *Infect. Immun. 69*, 5243–5248.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., **1995**. *Science 270*, 467–470.

Sebaugh, J.L., **2011**. *Pharm. Stat. 10*, 128–134.

Seeberger, P.H., Werz, D.B., **2007**. *Nature 446*, 1046–1051.

Sharon, N., Lis, H., **2004**. *Glycobiology 14*, 53R–62R.

Shaver, C.M., Hauser, A.R., **2004**. *Infect. Immun. 72*, 6969–6977.

Sheth, H.B., Lee, K.K., Wong, W.Y., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Hodges, R.S., Paranchych, W., Irvin, R.T., **1994**. *Mol. Microbiol. 11*, 715–723.

Shi, L., Gehin, T., Chevolot, Y., Souteyrand, E., Mangé, A., Solassol, J., Laurenceau, E., **2015**. *Anal. Bioanal. Chem.* 1–10.

Shipp, E.L., Hsieh-Wilson, L.C., **2007**. *Chem. Biol. 14*, 195–208.

Shipp, M., Nadella, R., Gao, H., Farkas, V., Sigrist, H., Faik, A., **2008**. *Glycoconj. J. 25*, 49–58.

Sicard, D., Cecioni, S., Iazykov, M., Chevolot, Y., Matthews, S.E., Praly, J.P., Souteyrand, E., Imberty, A., Vidal, S., Phaner-Goutorbe, M., **2012**. *Chem. Commun. 47*, 9483–9485.

Smith, E.A., Thomas, W.D., Kiessling, L.L., Corn, R.M., **2003**. *J. Am. Chem. Soc. 125*, 6140–6148.

Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R., Iglewski, B., **2002**. *J. Bacteriol.*, *184*, 1132–1139.

Song, W.S., Yoon, S. Il, **2014**. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 444*, 109–115.

Souteyrand, E., **1999**. *Analusis 27*, 639–648.

Spitzer, S., Eckstein, F., **1988**. *Nucl. Acids Res. 16*, 11691–11704.

Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., Wilson, I.A., **2006**. *Science 312*, 404–410.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., **2002**. *Annu. Rev. Microbiol. 56*, 187–209.

Tang, H., Kays, M., Prince, A., **1995**. *Infect. Immun. 63*, 1278–1285.

Tian, X., Pai, J., Shin, I., **2012**. *Chem. Asian J. 7*, 2052–2060.

Topin, J., Arnaud, J., Sarkar, A., Audfray, A., Gillon, E., Perez, S., Jamet, H., Varrot, A., Imberty, A., Thomas, A., **2013**. *PLoS ONE 8*, 1-13.

Turnbull, W.B., Stoddart, J.F., 2002. *Rev. Mol. Biotechnol. 90*, 231–255.

Valeur, B., **2001**. *Mol. Fluoresc.* 1–381.

Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A., **2001**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98*, 6911–6916.

Vargas-Berenguel, A., Ortega-Caballero, F., Santoyo-González, F., García-López, J.J., Giménez-Martínez, J.J., García-Fuentes, L., Ortiz-Salmerón, E., **2002**. *Chem. Eur. J. 8*, 812–827.

Velasco-Garcia, M.N., **2009**. *Semin. Cell Dev. Biol. 20*, 27–33.

Visini, R., Jin, X., Bergmann, M., Michaud, G., Pertici, F., Fu, O., Pukin, A., Branson, T.R., Thies-Weesie, D.M.E., Kemmink, J., Gillon, E., Imberty, A., Stocker, A., Darbre, T., Pieters, R.J., Reymond, J.L., **2015**. *ACS Chem. Biol. 10*, 2455–2462.

Voit, B., Appelhans, D., **2010**. *Macromol. Chem. Phys. 211*, 727–735.

Vrany, J.D., Stewart, P.S., Suci, P.A., **1997**. *Antimicrob. Agents Chemother. 41*, 1352–1358.

Vrasidas, I., Mol, N.J. De, Liskamp, R.M.J., Pieters, R.J., de Mol, N.J., **2001**. *Eur. J. Org. Chem.* 4685–4692.

Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., **2003**. *Antimicrob. Agents Chemother. 47*, 317–323.

Wang, D., Carroll, G.T., Turro, N.J., Koberstein, J.T., Kovác, P., Saksena, R., Adamo, R., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., Steinman, L., **2007**. *Proteomics* 7, 180–184.

Wang, D.N., **2003**. *Proteomics 3*, 2167–2175.

Wang, D.N., Liu, S.Y., Trummer, B.J., Deng, C., Wang, A.L., **2002**. *Nature Biotechnol. 20*, 275–281.

Wang, L., Cummings, R.D., Smith, D.F., Huflejt, M., Campbell, C.T., Gildersleeve, J.C., Gerlach, J.Q., Kilcoyne, M., Joshi, L., Serna, S., Reichardt, N.C., Pera, N.P., Pieters, R.J., Eng, W., Mahal, L.K., **2014**. *Glycobiology 24*, 507–517.

Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T., Case, D.A., **1986**. *J. Comp. Chem. 7*, 230–252.

Wick, M.J., Frank, D.W., Storey, D.G., Iglewski, B.H., **1990**. *Annu. Rev. Microbiol. 44*, 335–363.

Willats, W.G.T., Rasmussen, S.E., Kristensen, T., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., **2002**. *Proteomics 2*, 1666–1671.

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P., **2000**. *J. Bacteriol. 182*, 6401–6411.

Wittmann, V., Pieters, R.J., **2013**. *Chem. Soc. Rev. 42*, 4492–503.

Woller, E.K., Cloninger, M.J., **2001**. *Biomacromolecules 2*, 1052–1054.

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

Wood, R.W., **1902**. *Philos. Mag. Ser. 4*, 396–402.

Wu, A.M., Wu, J.H., Singh, T., Liu, J.-H., Tsai, M.-S., Gilboa-Garber, N., **2006**. *Biochimie 88*, 1479–1492.

Wu, C.Y., Liang, P.H., Wong, C.H., **2009**. *Org. Biomol. Chem. 7*, 2247–2254.

Yang, J., Chazalviel, J.N., Siriwardena, A., Boukherroub, R., Ozanam, F., Szunerits, S., Gouget-Laemmel, A.C., **2014**. *Anal. Chem. 86*, 10340–10349.

Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., **2007**. *Microbiology 153*, 1318–1328.

Yilmaz, G., Becer, C.R., **2015**. *Polym. Chem. 6*, 5503–5514.

Zhang, J., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Praly, J.P., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Morvan, F., Chevolot, Y., **2009a**. *Biosens. Bioelectron. 24*, 2515–2521.

Zhang, J., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S., Praly, J.P., Souteyrand, E., Vasseur, J.J., Morvan, F., Chevolot, Y., **2009b**. *Chem. Commun.* 6795-6797.

Zhang, Y., Li, Q., Rodriguez, L.G., Gildersleeve, J.C., **2010**. *J. Am. Chem. Soc. 132*, 9653–9662.

Zhang, Y., Yao, Q., Xia, C., Jiang, X., Wang, P.G., **2006**. *ChemMedChem 1*, 1361–1366.

Zheng, X., Bi, C., Li, Z., Podariu, M., Hage, D.S., **2015**. *J. Pharm. Biomed. Anal. 113*, 1–18.

Zinger-Yosovich, K.D., Gilboa-Garber, N., **2009**. *J. Agric. Food Chem. 57*, 6908–6913.

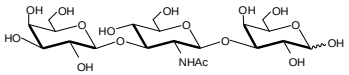
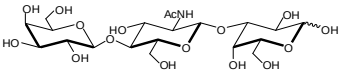
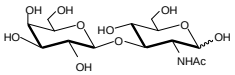
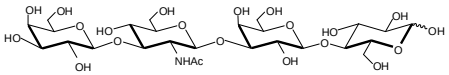
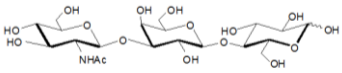
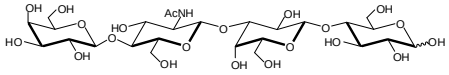
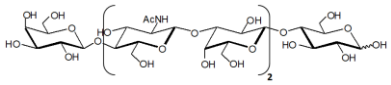
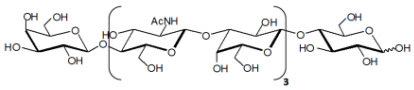
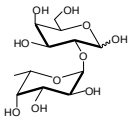
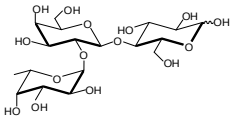
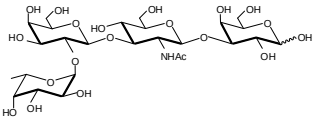
Zinger-Yosovich, K.D., Iluz, D., Sudakevitz, D., Gilboa-Garber, N., **2010**. *J. Dairy Sci. 93*, 473–482.

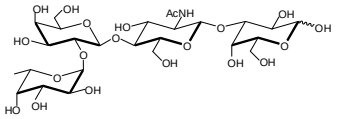
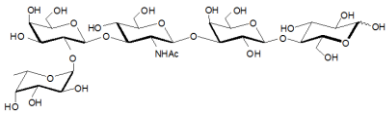
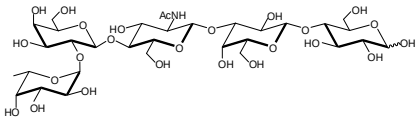
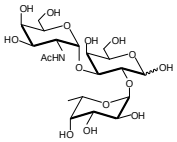
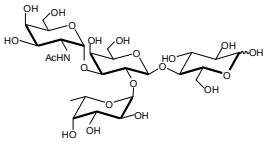
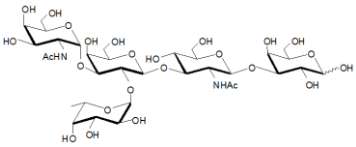
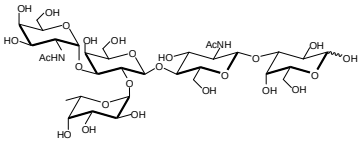
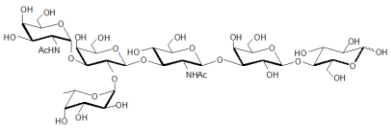
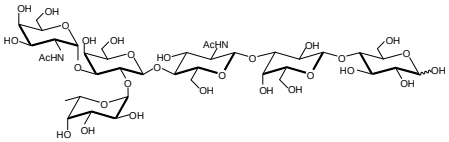
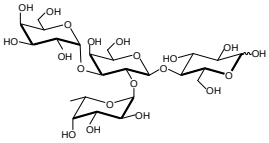
Zondlo, N.J., **2013**. *Acc. Chem. Res. 46*, 1039–1049.

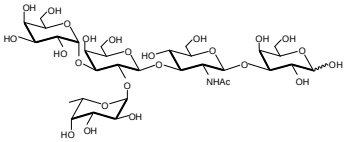
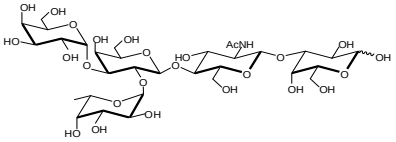
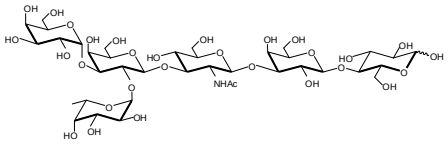
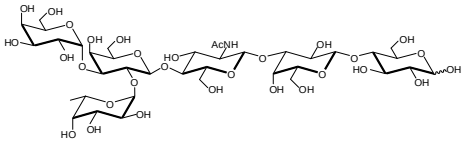
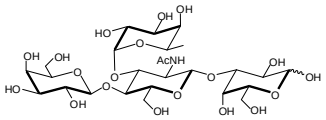
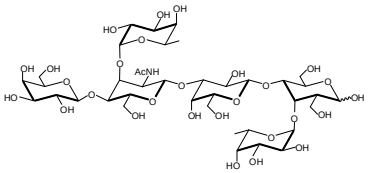
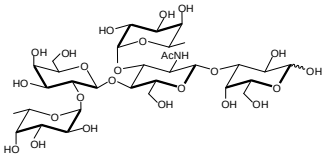
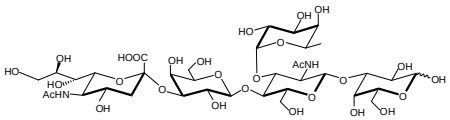
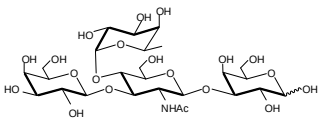
Annexes

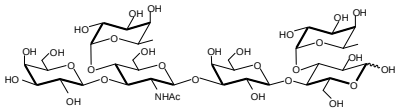
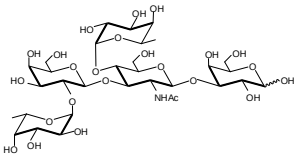
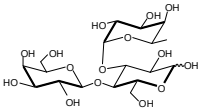
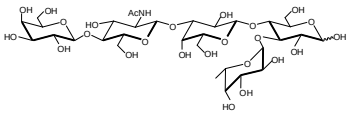
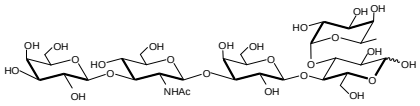
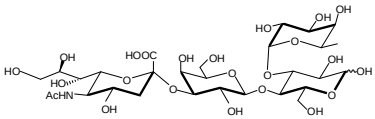
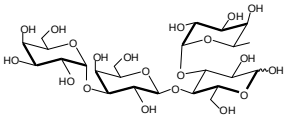
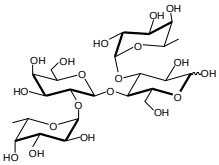
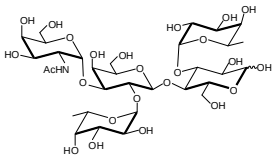
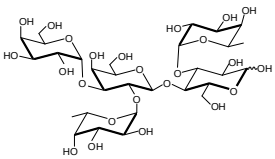
Annexe A Structures développées de la bibliothèque de sucres

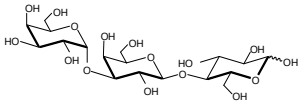
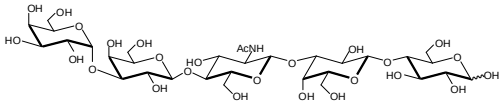
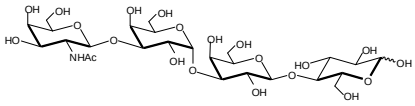
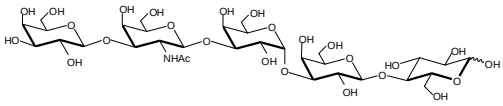
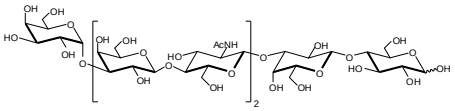
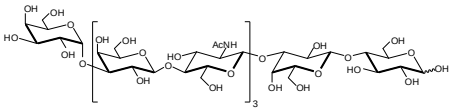
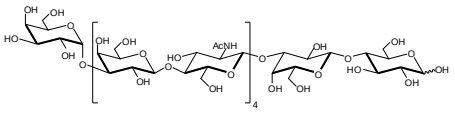
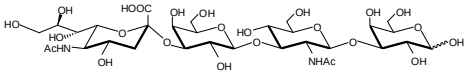
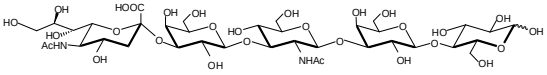
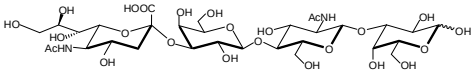
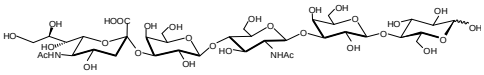
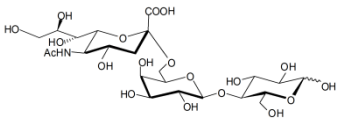
A.1. Les sucres produits par fermentation bactérienne

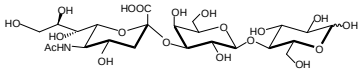
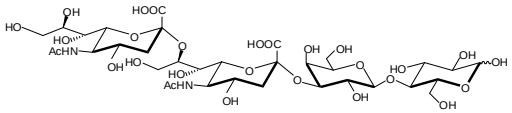
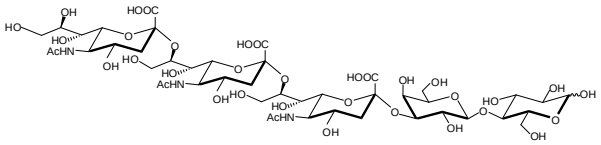
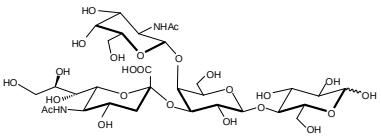
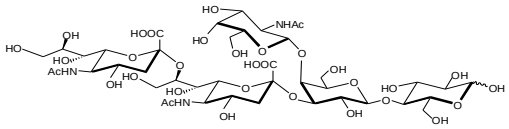
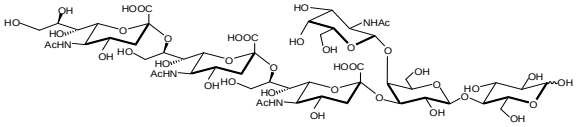
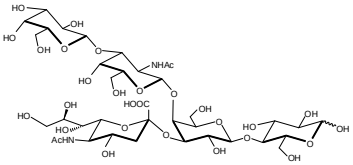
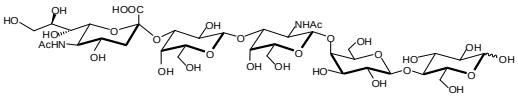
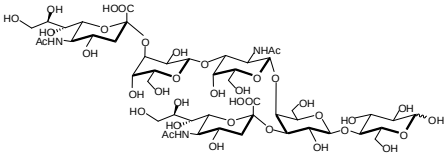
Famille	Nom – Structure développée	Réf.	Id.
Core structures	Galβ-3GlcNAcβ-4Gal 	GLY005	1
	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal 	GLY006	2
	Galβ-3GlcNAc 	GLY009	3
	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY010	4
	GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY011	5
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY021	6
	Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_2$Glc 	GLY022	7
	Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_3$Glc 	GLY023	8
Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Gal 	GLY030	9
	Fucα1-2Galβ1-4Glc 	GLY031-3	10
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal 	GLY032-1	11

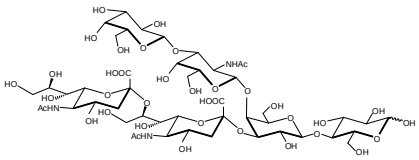
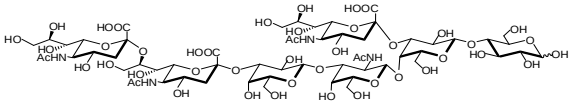
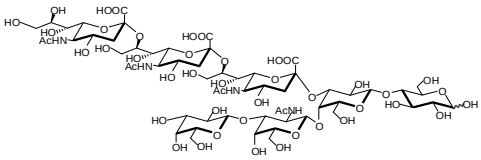
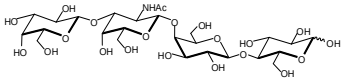
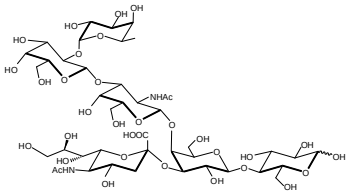
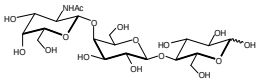
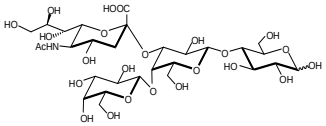
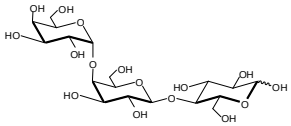
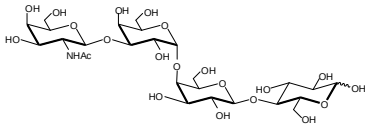
Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal 	GLY032-2	12
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY033-1	13
	Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY033-2	14
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal 	GLY034	15
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc 	GLY035-3	16
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal 	GLY036-1	17
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal 	GLY036-2	18
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY037-1	19
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY037-2	20
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc 	GLY038-3	21

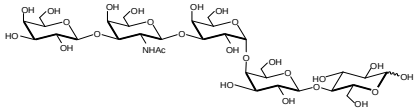
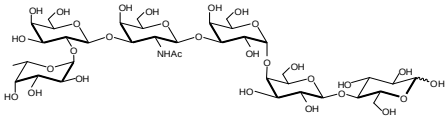
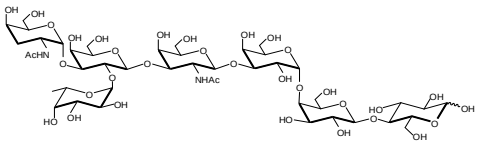
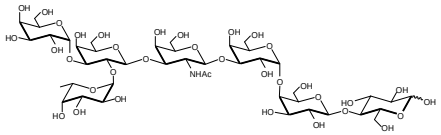
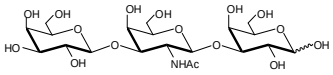
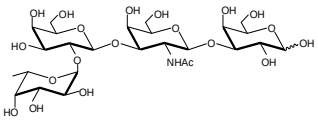
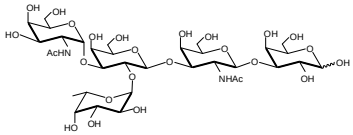
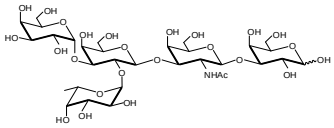
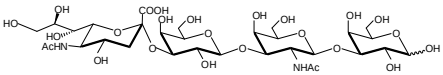
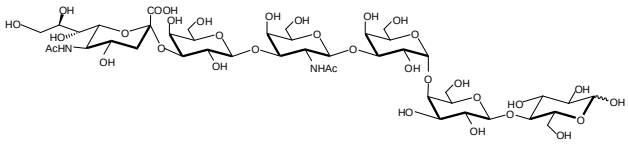
Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal 	GLY039-1	22
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal 	GLY039-2	23
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY040-1	24
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY040-2	25
	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal 	GLY050	26
	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY051	27
	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal 	GLY052	28
	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal 	GLY053	29
	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal 	GLY054	30

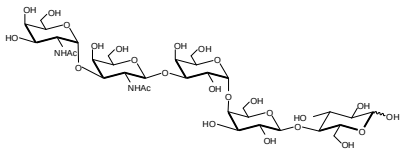
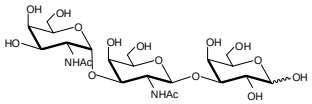
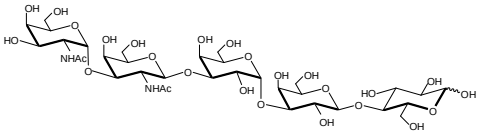
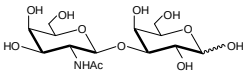
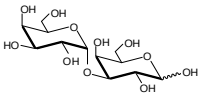
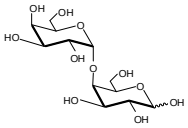
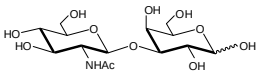
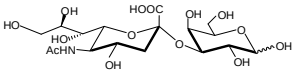
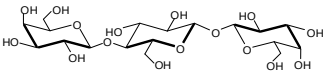
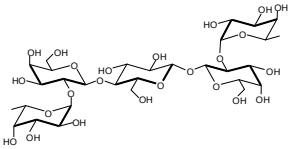
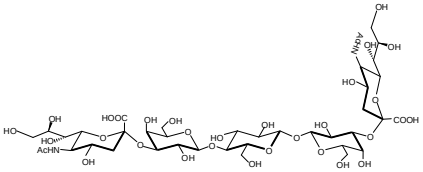
Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY055	31
	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal 	GLY056	32
Oligosaccharides fucosylés	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY060	33
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY061	34
	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY062	35
	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY063	36
	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY064	37
	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY066	38
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY067	39
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc 	GLY068	40

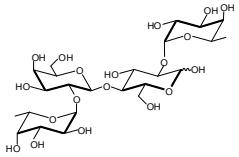
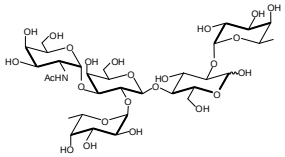
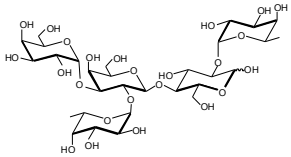
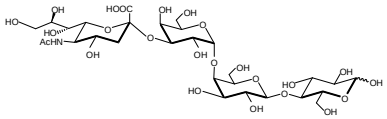
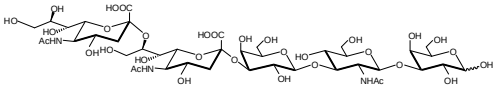
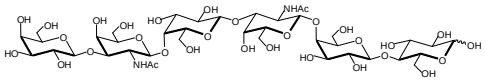
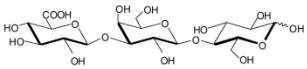
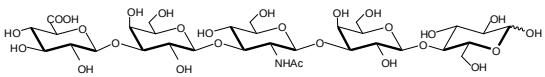
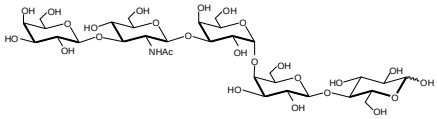
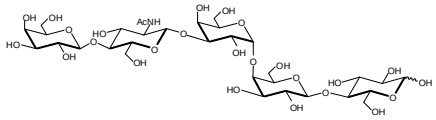
Oligosaccharides à motif « Galα1-3Gal »	Galα1-3Galβ1-4Glc 	GLY070	41
	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY071	42
	GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc 	GLY072	43
	Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc 	GLY073	44
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_2$Galβ1-4Glc 	GLY077	45
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_3$Galβ1-4Glc 	GLY078	46
	Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)4Galβ1-4Glc 	GLY079	47
Oligosaccharides sialilés	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal 	GLY080	48
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY081	49
	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal 	GLY082	50
	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY083	51
Oligosaccharides type ganglioside	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glc 	GLY089	52

Oligosaccharides type ganglioside	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc 	GLY090	53
	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc 	GLY091	54
	Neu5Acα2-8Neu5Acβ2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc 	GLY092	55
	GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY093	56
	GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY094	57
	GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY095	58
	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY096	59
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 	GLY097	60
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY098	61

Oligosaccharides type ganglioside	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY099	62
	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY100	63
	Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY101	64
	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 	GLY102	65
	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY103	66
	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 	GLY104	67
	Galβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc 	GLY111	68
Oligosaccharides type globoside (antigènes P)	Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY120	69
	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY121	70

Oligosaccharides type globoside (antigènes P)	Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY122	71
	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY123	72
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY124	73
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY125	74
Core structure	Galβ1-3GalNAc β1-3Gal 	GLY126	75
Antigènes des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal 	GLY127	76
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal 	GLY128	77
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal 	GLY129	78
Oligosaccharides type globoside (antigènes P)	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal 	GLY130	79
	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY131	80

Oligosaccharides type globoside (antigènes P)	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY132	81
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Gal 	GLY133	82
	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc 	GLY134	83
Disaccharides	GalNAcβ1-3Gal 	GLY151	84
	Galα1-3Gal 	GLY153	85
	Galα1-4Gal 	GLY154	86
	GlcNAcβ1-3Gal 	GLY155	87
	Neu5Acα2-3Gal 	GLY157	88
Oligosaccharides dérivant du tréhalose	Galβ1-4Glcβ1-1βGal 	GLY160	89
	Fucα1-2Galβ1-4Glcβ1-1βGalα2-1Fuc 	GLY161	90
	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ1-1βGalα2-3Neu5Ac 	GLY162	91

Antigènes dérivant des groupes sanguins (ABO) et de Lewis	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-2)Glc 	GLY163	92
	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc 	GLY164	93
	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc 	GLY165	94
Oligosaccharides dérivant des globosides (antigènes P)	Neu5Acα2-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY171	95
Oligosaccharides sialilés	NeuAcα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal 	GLY172	96
Oligosaccharides dérivant des gangliosides	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc 	GLY174	97
Oligosaccharides glucuroniques	GlcAβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY180	98
	GlcAβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 	GLY181	99
Oligosaccharides dérivant des globosides (antigènes P)	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY191-1	100
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY191-2	101

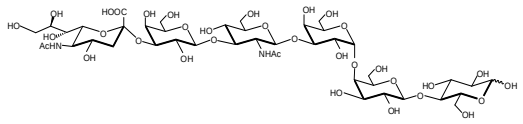
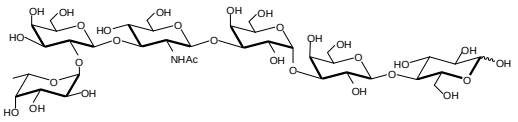
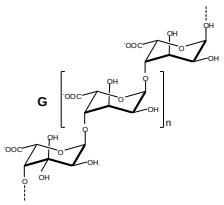
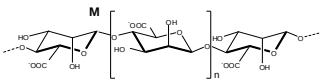
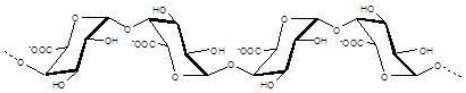
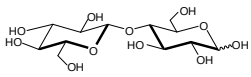
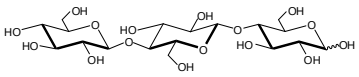
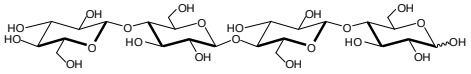
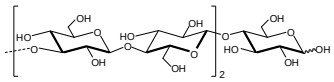
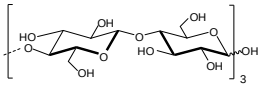
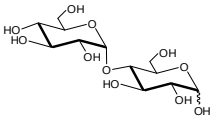
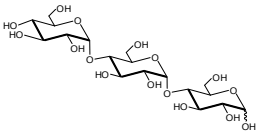
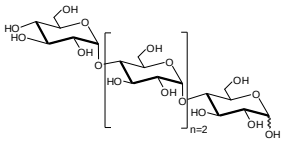
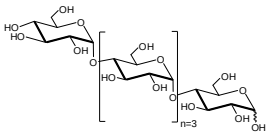
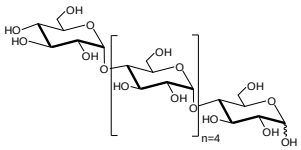
Oligosaccharides dérivant des globosides (antigènes P)	NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 	GLY195-1	102
	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc 	GLY201-1	103

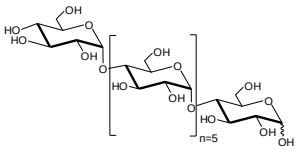
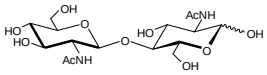
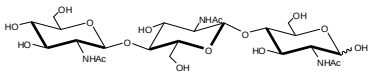
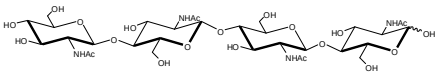
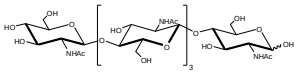
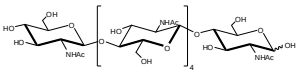
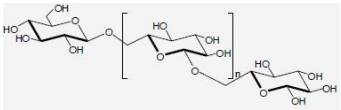
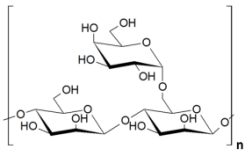
Tableau A-1 : Structures développées des sucres produits par fermentation bactérienne.

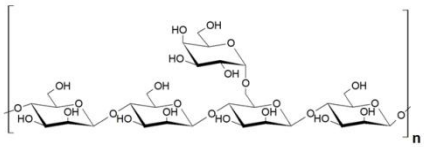
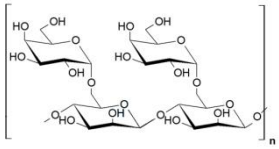
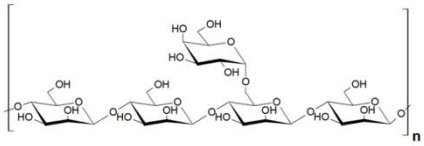
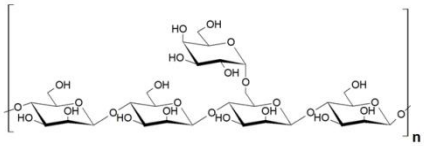
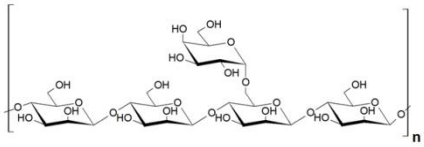
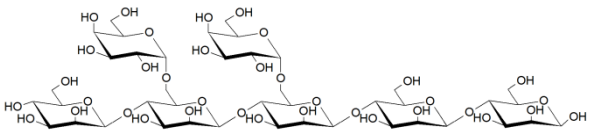
A.2. Les sucres issus de la biomasse

Famille	Nom – Structure développée	Réf.	Id.
Alginates	L-guluronate lié en α(1-4), DP ≈ 20 ; M/G ratio<0.25 	ALG300	104
	L-guluronate lié en α(1-4), DP ≈ 10 ; M/G ratio<0.25	ALG310	105
	L-guluronate lié en α(1-4), DP ≈ 5 ; M/G ratio<0.25	ALG320	106
	L-guluronate lié en α(1-4), DP ≈ 3 ; M/G ratio<0.25	ALG330	107
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 20 M/G ratio>4 	ALG500	108
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 10 M/G ratio>4	ALG510	109
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 5 M/G ratio>4	ALG520	110
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 3 M/G ratio>4	ALG530	111
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 30-50 M/G ratio>4	ALG600	112
	D-mannuronate lié en β(1-4), DP ≈ 20-35 M/G ratio>4	ALG601	113

Galacturonanes	D-galacturonate lié en α(1-4), DP ≈ 25 	GAT110	114
	D-galacturonate lié en α(1-4), DP = 3/4	GAT111	115
	D-galacturonate lié en α(1-4), DP = 7/8	GAT112	116
Glucanes	oligosaccharides avec environ 80 % **GXLF** α-L-Fuc 1 ↓ 2 β-D-Gal β-D-Gal 1 1 ↓ ↓ 2 2 α-D-Xyl α-D-Xyl α-D-Xyl 1 1 1 ↓ ↓ ↓ 6 6 6 β-D-Glc1→ 4 β-D-Glc1→ 4β-D-Glc1→ 4β-D-Glc G X L F	GLU1000	117
	oligosaccharides avec environ 80 % **XFG** α-L-Fuc 1 ↓ 2 β-D-Gal 1 ↓ 2 α-D-Xyl α-D-Xyl 1 1 ↓ ↓ 6 6 β-D-Glc1→4β-D-Glc1→4β-D-Glc X F G	GLU1110	118
	oligosaccharides avec environ 60 % **XXFG** α-L-Fuc 1 ↓ 2 β-D-Gal 1 ↓ 2 α-D-Xyl α-D-Xyl α-D-Xyl 1 1 1 ↓ ↓ ↓ 6 6 6 β-D-Glc1→ 4β-D-Glc1→ 4β-D-Glc1→ 4β-D-Glc X X F G	GLU1150	119
	oligosaccharides avec environ 60 % **XLFG** α-L-Fuc 1 ↓ 2 β-D-Gal β-D-Gal 1 1 ↓ ↓ 2 2 α-D-Xyl α-D-Xyl α-D-Xyl 1 1 1 ↓ ↓ ↓ 6 6 6 β-D-Glc1→ 4β-D-Glc1→ 4β-D-Glc1→ 4β-D-Glc X L F G	GLU1160	120
	Glcβ1-4Glc 	GLU300	121

Glucanes	Glcβ1-4Glcβ1-4Glc 	GLU301	122
	Glcβ1-4Glcβ1-4Glcβ1-4Glc 	GLU302	123
	$[Glc\beta1\text{-}4Glc\beta1\text{-}4]_2Glc$ 	GLU303	124
	$Glc\beta1\text{-}4[Glc\beta1\text{-}4Glc\beta1\text{-}4]_2Glc$ 	GLU304	125
	Glcα1-4Glc 	GLU312	126
	Glcα1-4Glcα1-4Glc 	GLU313	127
	Glcα1-4Glcα1-4Glcα1-4Glc 	GLU314	128
	$[Glc\alpha1\text{-}4Glc\alpha1\text{-}4]_2Glc$ 	GLU315	129
	$Glc\alpha1\text{-}4[Glc\alpha1\text{-}4Glc\alpha1\text{-}4]_2Glc$ 	GLU316	130

Glucanes	[Glcα1-4Glcα1-4Glcα1-4]$_2$Glc 	GLU317	131
	GlcNAcβ1-4GlcNAc 	GLU432	132
	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc 	GLU433	133
	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc 	GLU434	134
	GlcNAcβ1-4[GlcNAcβ1-4]$_3$Glc 	GLU435	135
	GlcNAcβ1-4[GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4]$_2$GlcNAc 	GLU436	136
	[Glcβ1-6Glc]$_n$, DP ≤ 10 	GLU910	137
Mannanes	[Manβ1-4(Galα1-6)Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 2:1 	MAN200	138

Mannanes	[Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1 	MAN201	139
	[(Galα1-6)Manβ1-4[(Galα1-6)Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 1:1 	MAN202	140
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 3. 	MAN213	141
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 5. 	MAN215	142
	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 9. 	MAN219	143
	Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man 	MAN300	144

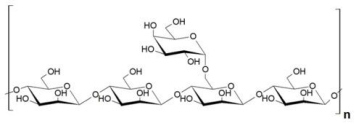
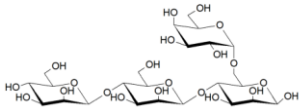
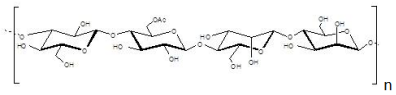
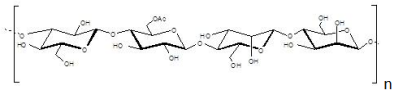
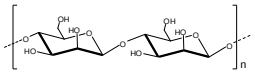
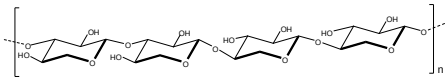
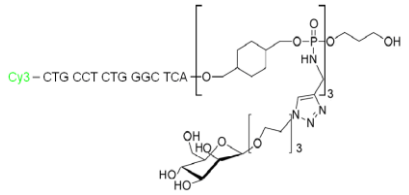
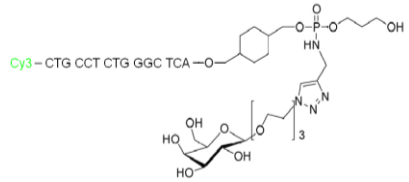
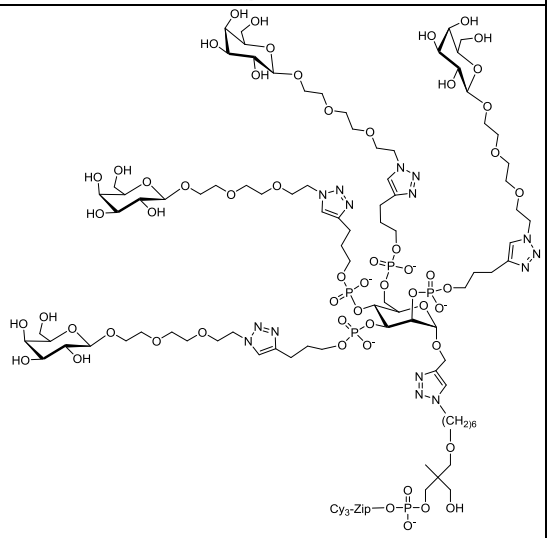
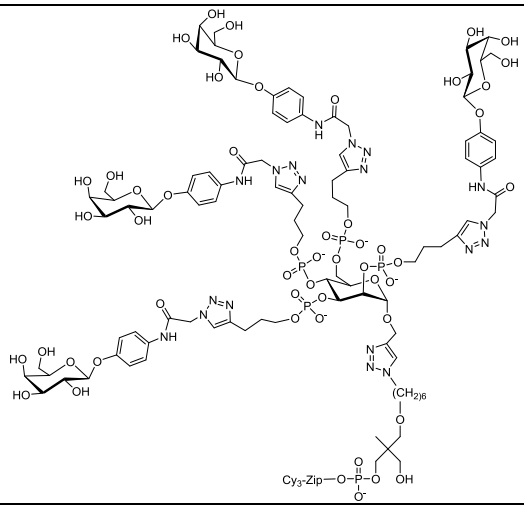
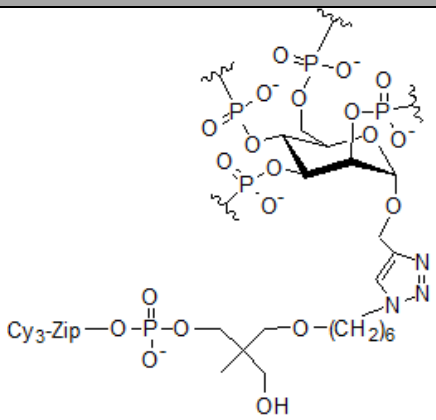
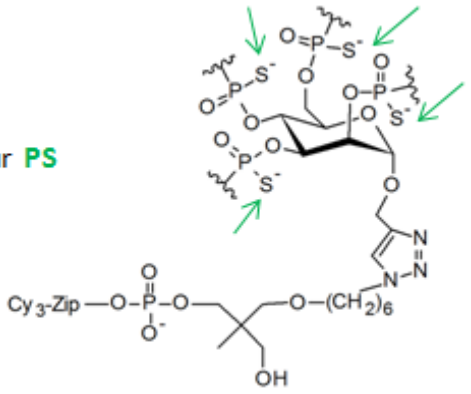
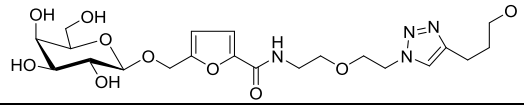
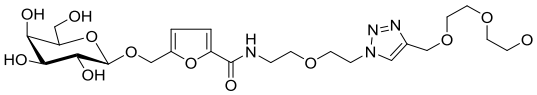
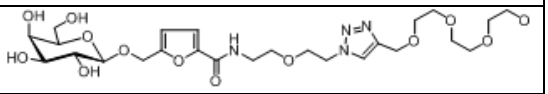
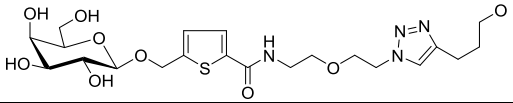
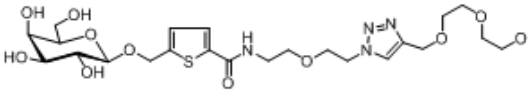
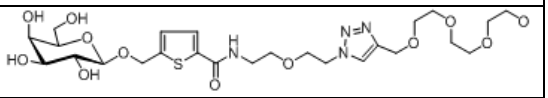
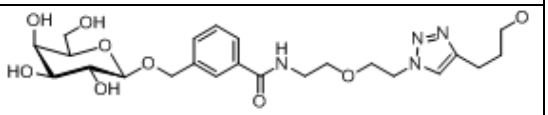
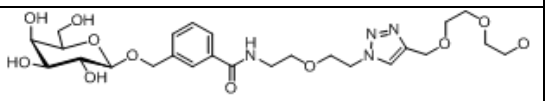
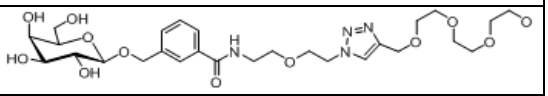
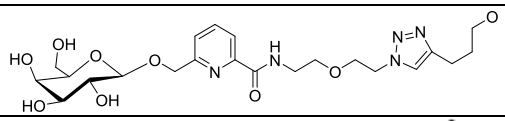
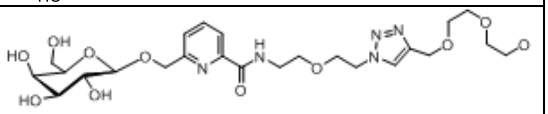
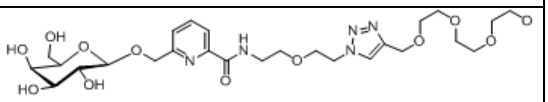
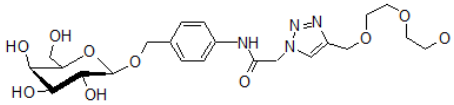
Mannanes	[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP = 3. 	MAN400	145
	Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man 	MAN500	146
	Motif typique du polysaccharide : [Glcβ1-4GlcAcβ1-4Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Glc}$ ≈ 1/5 	MAN600	147
	Motif typique du polysaccharide : [Glcβ1-4GlcAcβ1-4Manβ1-4Man]$_n$ 	MAN610	148
	D-mannose lié en β(1-4) (Noix de coco). 	MAN800	149
	D-mannose lié en β1-4 partiellement O-acetylé (*Aloe vera*)	MAN801	150
	Polysaccharide de D-mannose relié en α1-6 et fortement ramifié avec une chaine du D-Mannose en α1-2 et α1-3 (Levure).	MAN802	151
	D-mannose lié en β1-4, DP = 2 à 24	MAN810	152
Ulvanes	Oligosaccharides entre 3 et 5 kDa (*Ulva armoricana*)	ULV001	153
	Oligosaccharides entre 1 et 3 kDa (*Ulva armoricana*)	ULV002	154
	Oligosaccharides entre 0.65 et 1 kDa (*Ulva armoricana*)	ULV003	155
Xylane	Oligosaccharides avec DP = 2 à 25 (*Palmaria palmata*) 	XYL110	156

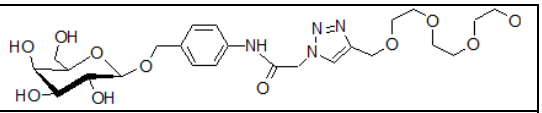
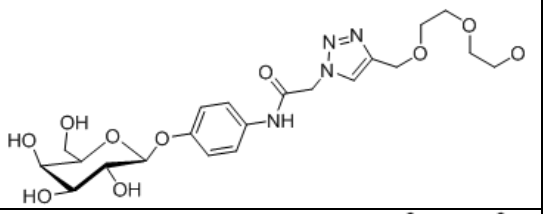
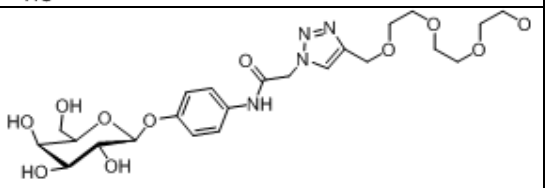
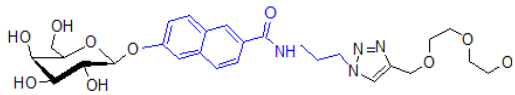
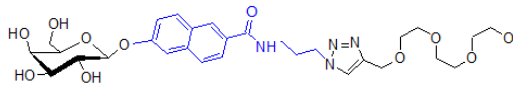
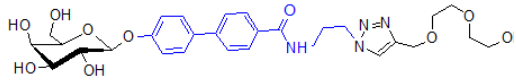
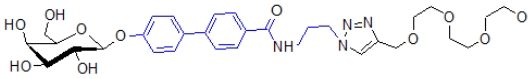
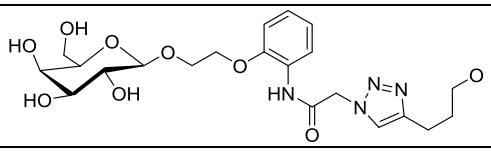
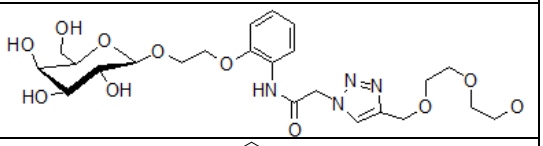
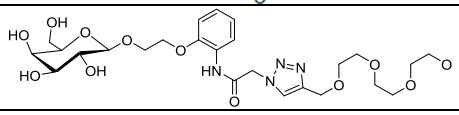
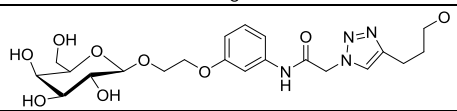
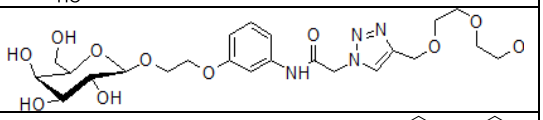
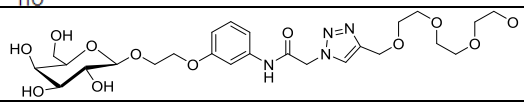
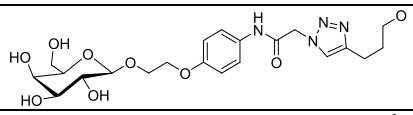
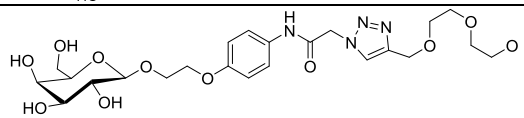
Tableau A-2 : Structures développées des sucres issus de la biomasse.

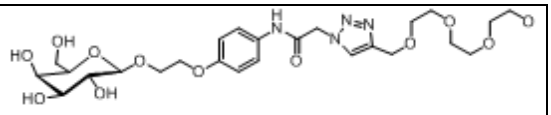
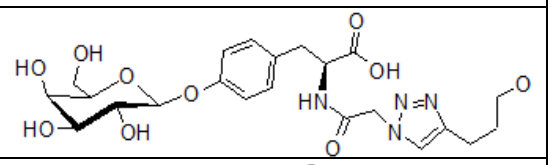
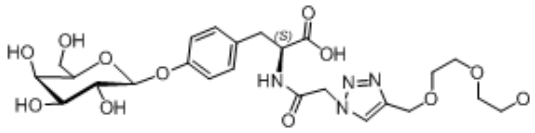
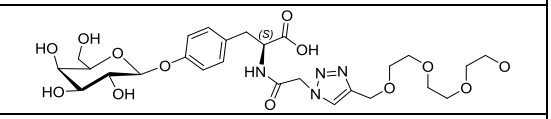
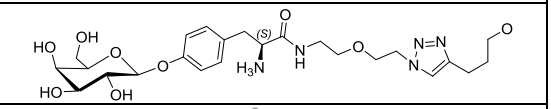
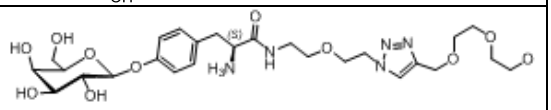
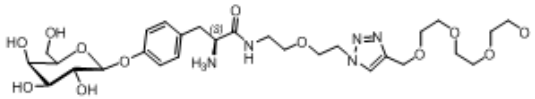
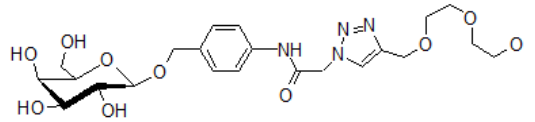
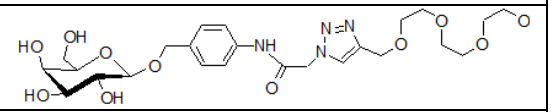
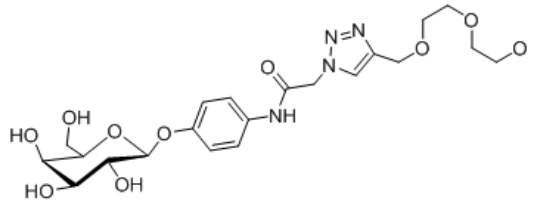
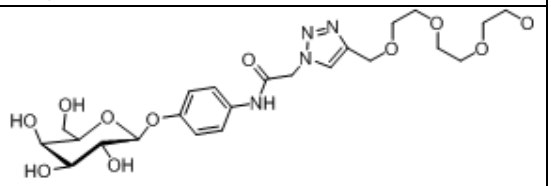
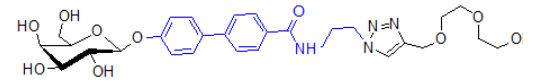
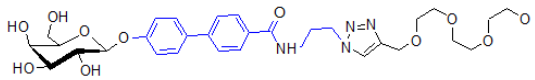
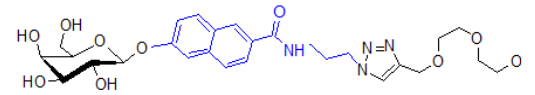
Annexe B Structures développées des glycoclusters

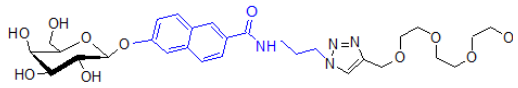
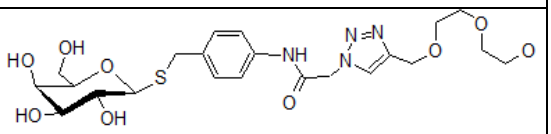
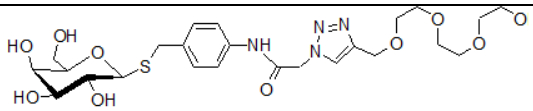
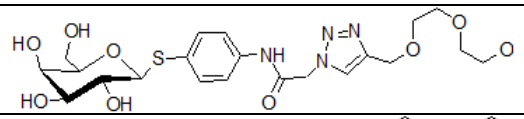
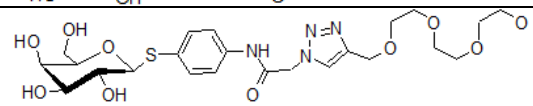
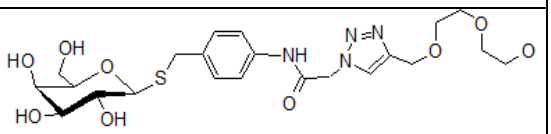
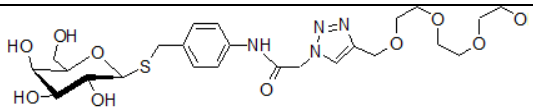
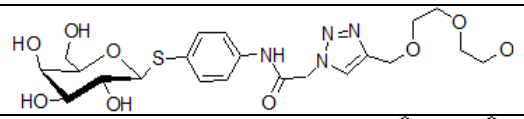
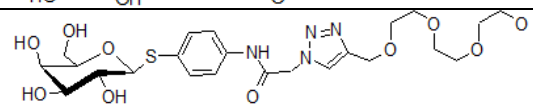
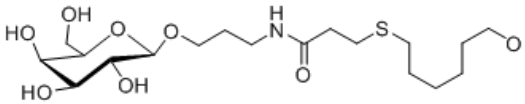
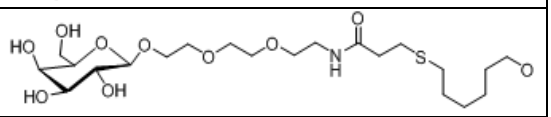
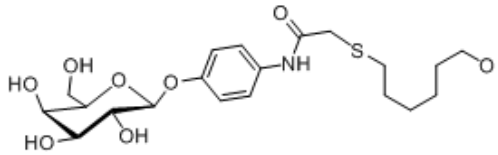
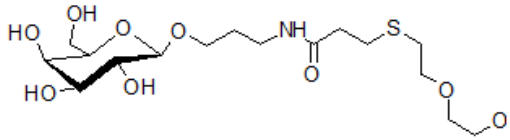
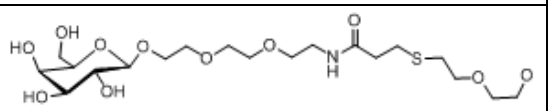
B.1. Glycoclusters ciblant PA-IL

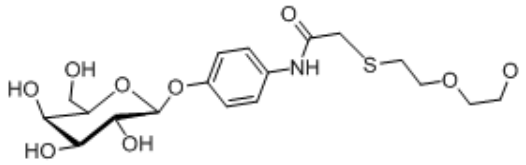
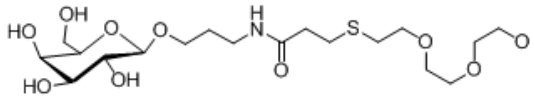
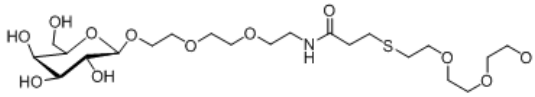
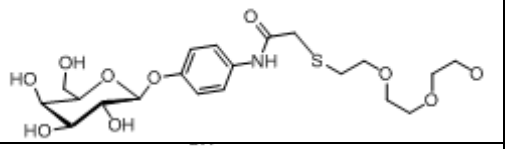
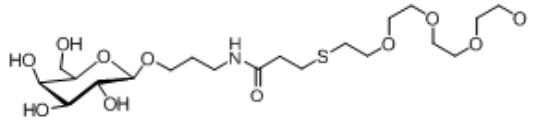
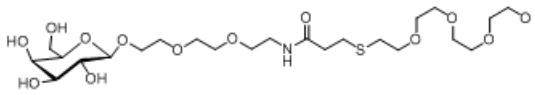
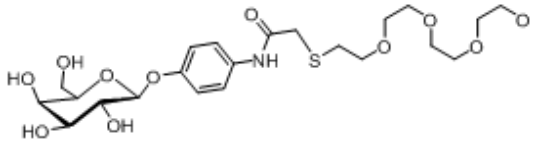
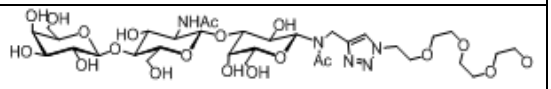
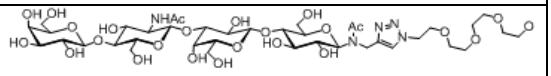
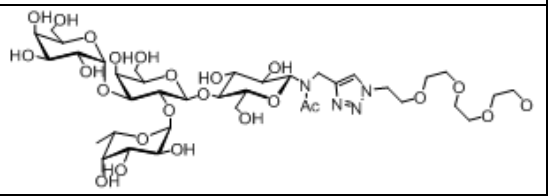
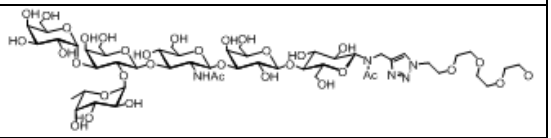
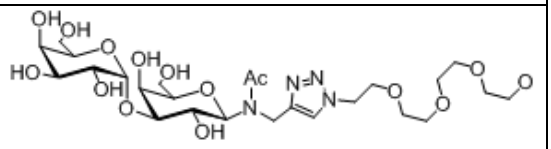
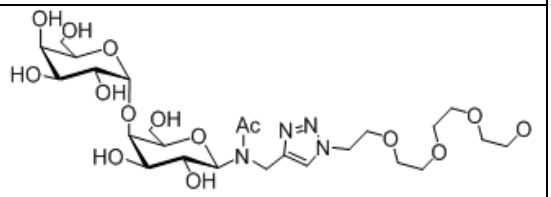
Id.	Nom	ADN	Réf. labo	Structure développée
Témoins				
TN_1	ADN simple brin	1.1	/	/
TN_2	(DMCH-MTzEG$_3$-Man)$_3$	1.1	CB26C3	
TP_1	DMCH-MTzEG$_3$-Gal	1.1	CB26C1	
G1	Man(proTz EG$_3$-Gal)$_4$	1.1	80B	
G2	Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$	1.1 ou 1.3	80E ou FC36	

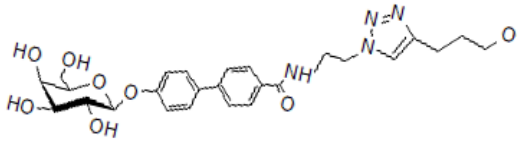
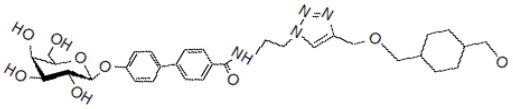
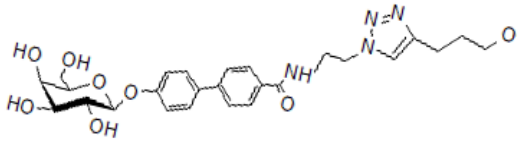
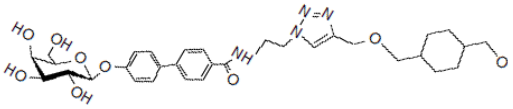
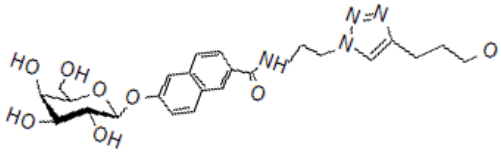
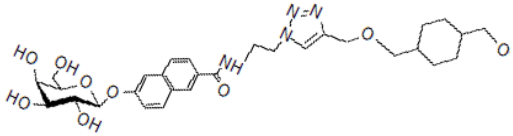
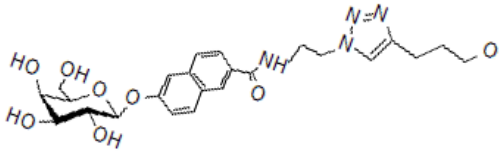
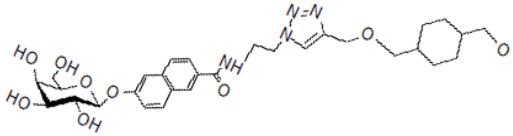
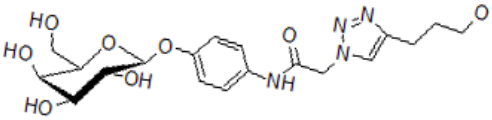
Glycoclusters à Cœur Mannose				
		ou pour **PS**		
1	Man(proTzEG$_2$NOCFurM-Gal)$_4$	1,3	4MN98	
2	Man(EG$_2$MTzEG2NOCFurM-Gal)$_4$	1,4	4MN103	
3	Man(EG$_3$MTzEG2NOCFurM-Gal)$_4$	1,2	4MN108	
4	Man(proTzEG$_2$NOCThiophM-Gal)$_4$	1,3	4MN99	
5	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NOCThiophM-Gal)$_4$	1,4	4MN104	
6	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOCThiophM-Gal)$_4$	1,2	4MN109	
7	Man(proTzEG$_2$NOC^{3}Bn-Gal)$_4$	1,3	4MN100	
8	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NOC^{3}Bn-Gal)$_4$	1,4	4MN105	
9	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOC^{3}Bn-Gal)$_4$	1,2	4MN110	
10	Man(proTzEG$_2$NOC^{3}PyrM-Gal)$_4$	1,3	4MN89	
11	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NOC^{3}PyrM -Gal)$_4$	1,4	5MN20	
12	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NOC^{3}PyrM -Gal)$_4$	1,2	5MN21	
13	Man(EG$_2$MTzAcNBn-Gal)$_4$	1.3	FC17	

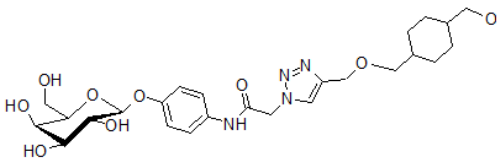
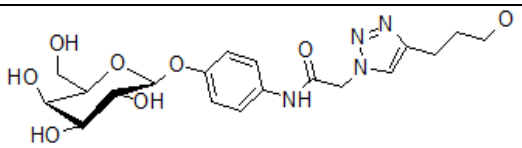
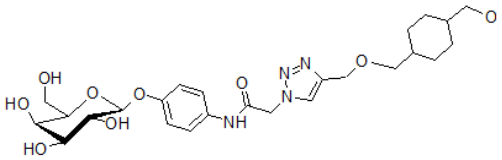
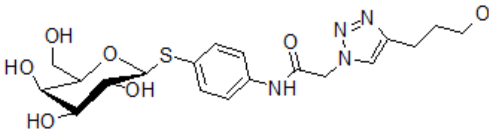
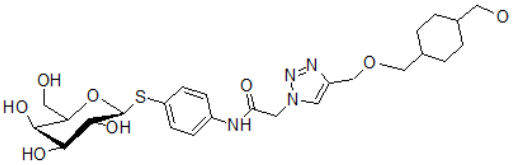
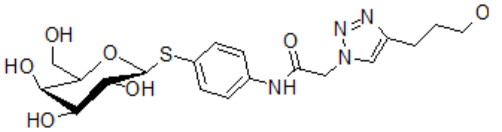
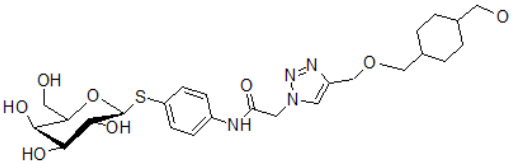
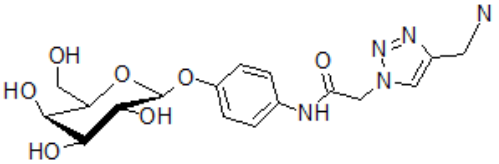
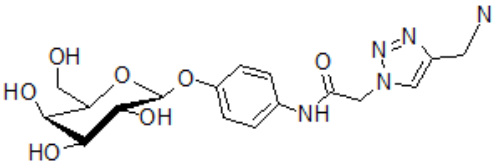
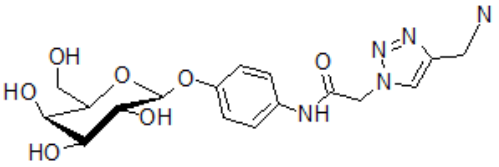
14	Man(EG$_3$MTzAcNBn-Gal)$_4$	1.2	FC14	
15	Man(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_4$	1.1 ou 1.2	BG68 ou 4MN50	
16	Man(EG$_3$MTzAcNPh-Gal)$_4$	1.4	LC04-389	
17	Man(EG$_2$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	1.3	FC21	
18	Man(EG$_3$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	1.10	FC23	
19	Man(EG$_2$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	1.3	FC22	
20	Man(EG$_3$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	1.10	FC24	
21	Man(proTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	1,3	FC30	
22	Man(EG$_2$MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	1,4	5MN40	
23	Man(EG$_3$MTzAcN^{2}PhOEt-Gal)$_4$	1,4	FC34	
24	Man(proTzAcN^{3}PhOEt-Gal)$_4$	1,3	FC31	
25	Man(EG$_2$MTzAcN^{3}PhOEt-Gal)$_4$	1,4	5MN41	
26	Man(EG$_3$MTzAcN^{3}PhOEt-Gal)$_4$	1,4	FC35	
27	Man(proTzAcNPhOEt-Gal)$_4$	1,3	FC32	
28	Man(EG$_2$MTzAcNPhOEt-Gal)$_4$	1,4	5MN19	

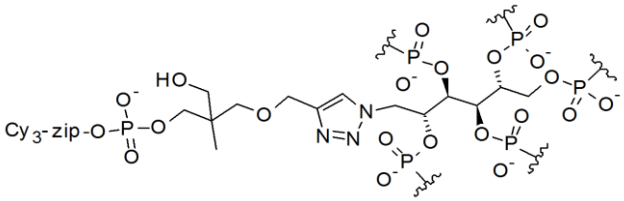
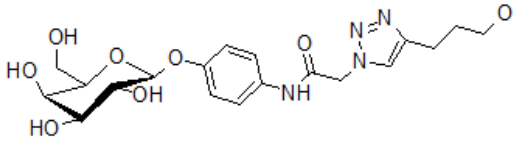
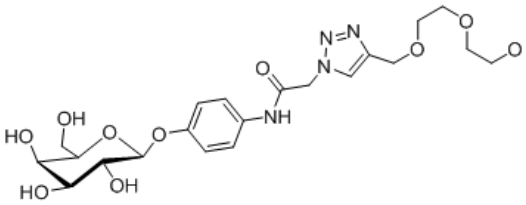
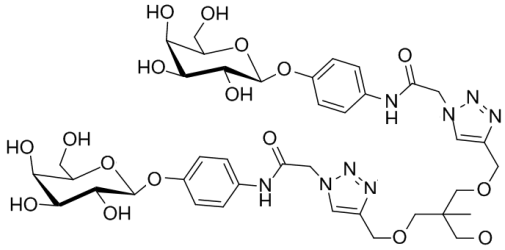
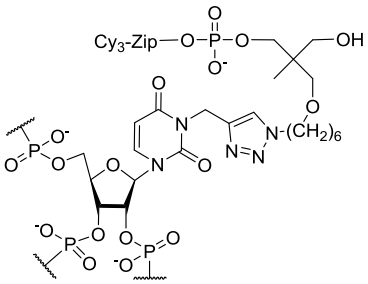
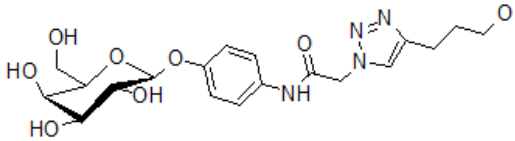
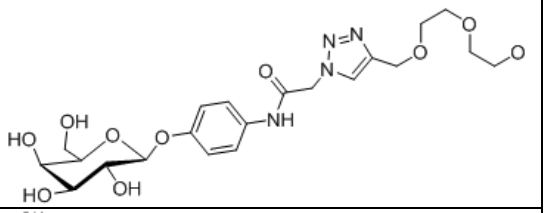
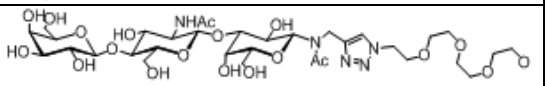
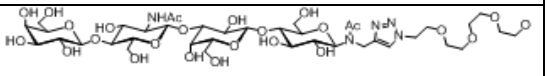
29	Man(EG$_3$MTzAcNPhOEt-Gal)$_4$	1,4	FC33	
30	Man(proTzAcTyr-Gal)$_4$	1,3	4MN101	
31	Man(EG$_2$MTzAcTyr-Gal)$_4$	1,4	4MN106	
32	Man(EG$_3$MTzAcTyr-Gal)$_4$	1,2	4MN111	
33	Man(proTzEG$_2$NTyr-Gal)$_4$	1,3	4MN102	
34	Man(EG$_2$MTzEG$_2$NTyr-Gal)$_4$	1,4	4MN107	
35	Man(EG$_3$MTzEG$_2$NTyr-Gal)$_4$	1,2	4MN112	
36	Man(PS-EG$_2$MTzAcNBn-Gal)$_4$	1.4	FC13	
37	Man(PS-EG$_3$MTzAcNBn-Gal)$_4$	1.6	FC12	
38	Man(PS-EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_4$	1.4	FC16	
39	Man(PS-EG$_3$MTzAcNPh-Gal)$_4$	1.1	FC15	
40	Man(PS-EG$_2$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	1.6	FC26	
41	Man(PS-EG$_3$MTzproNOCBiPh-Gal)$_4$	1.4	FC20	
42	Man(PS-EG$_2$MTzproNOCNapht-Gal)$_4$	1.6	FC25	

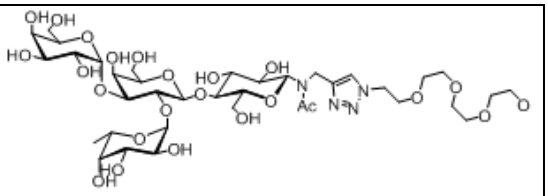
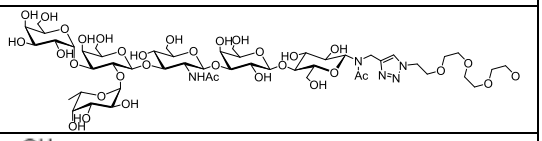
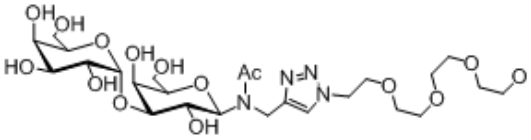
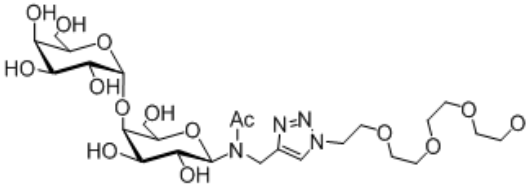
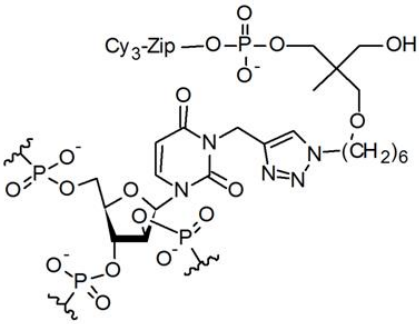
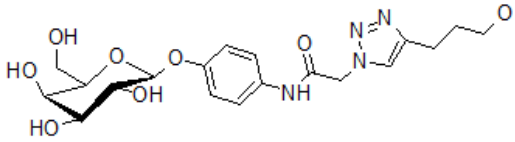
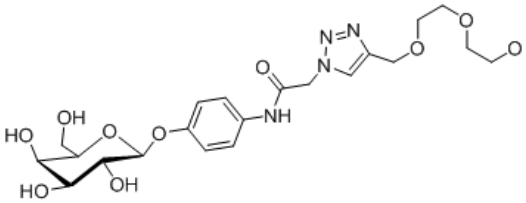
43	Man(PS-EG_3MTzproNOCNapht-Gal) $_4$	1.4	FC19	
44	Man(EG_2MTzAcNBn-SGal)$_4$	1.5	FC01	
45	Man(EG_3MTzAcNBn-SGal)$_4$	1.2	FC08	
46	Man(EG_2MTzAcNPh-SGal)$_4$	1.2	FC11	
47	Man(EG_3MTzAcNPh-SGal)$_4$	1.6	FC02	
48	Man(PS-EG_2MTzAcNBn-SGal)$_4$	1.5	FC06	
49	Man(PS-EG_3MTzAcNBn-SGal)$_4$	1.6	FC10	
50	Man(PS-EG_2MTzAcNPh-SGal)$_4$	1.5	FC07	
51	Man(PS-EG_3MTzAcNPh-SGal)$_4$	1.1	FC09	
52	Man(hexSMAcNpro-Gal)$_4$	1.2	LC04-442	
53	Man(hexSMAcNEG_3-Gal)$_4$	1.2	LC04-437	
54	Man(hexSAcNPh-Gal)$_4$	1.2	LC04-443	
55	Man(EG_2SMAcNpro-Gal)$_4$	1.3	LC04-439	
56	Man(EG_2SMAcNEG_3-Gal)$_4$	1.3	LC04-435	

57	Man(EG$_2$SAcNPh-Gal)$_4$	1.3	LC04-440	
58	Man(EG$_3$SMAcNpro-Gal)$_4$	1.4	LC04-429	
59	Man(EG$_3$SMAcNEG$_3$-Gal)$_4$	1.4	LC04-445	
60	Man(EG$_3$SAcNPh-Gal)$_4$	1.4	LC04-394	
61	Man(EG$_4$SMAcNpro-Gal)$_4$	1.5	LC04-433	
62	Man(EG$_4$SMAcNEG$_3$-Gal)$_4$	1.5	LC04-434	
63	Man(EG$_4$SAcNPh-Gal)$_4$	1.5	LC04-436	
64	Man(EG$_4$TzMNAc-Core type2)$_4$	1.10	4MN38	
65	Man(EG$_4$TzMNAc-LNnT)$_4$	1.10	3MN187	
66	Man(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_4$	1.10	4MN42	
67	Man(EG$_4$TzMNAc-6GrB)$_4$	1.10	4MN34	
68	Man(EG$_4$TzMNAc-Galα1-3Gal)$_4$	1.10	4MN75	
69	Man(EG$_4$TzMNAc-Galα1-4Gal)$_4$	1.10	4MN79	

Glycoclusters à cœur DMCH				
70	(DMCH-ProTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	1,5	FC43	
71	(DMCH-DMCHMTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	1,3	FC51	
72	(DMCH-PSProTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	1,2	FC39	
73	(DMCH-PSDMCHMTzProNOCBiPh-Gal)$_4$	1,4	FC47	
74	(DMCH-ProTzProNOCNapht-Gal)$_4$	1,5	FC44	
75	(DMCH-DMCHMTzProNOCNapht-Gal)$_4$	1,3	FC52	
76	(DMCH-PSProTzProNOCNapht-Gal)$_4$	1,2	FC40	
77	(DMCH-PSDMCHMTzProNOCNapht-Gal)$_4$	1,4	FC48	
78	(DMCH-ProTzAcNPh-Gal)$_4$	1,5	FC41	

79	(DMCH-DMCHMTzAcNPh-Gal)$_4$	1,3	FC49	
80	(DMCH-PSProTzAcNPh-Gal)$_4$	1,2	FC37	
81	(DMCH-PSDMCHMTzAcNPh-Gal)	1,4	FC45	
82	(DMCH-ProTzAcNPh-SGal)$_4$	1,5	FC42	
83	(DMCH-DMCHMTzAcNPh-SGal)$_4$	1,3	FC50	
84	(DMCH-PSProTzAcNPh-SGal)$_4$	1,2	FC38	
85	(DMCH-PSDMCHMTzAcNPh-SGal)$_4$	1,4	FC46	
86	(DMCH-MTzAcNPh-Gal)$_3$	1.1	BG03	
87	(DMCH-MTzAcNPh-Gal)$_4$	1.1	BG04	
88	(DMCH-MTzAcNPh-Gal)$_5$	1.1	BG05	

Glycoclusters à cœur mannitol				
				
89	Mannitol(proTzAcNPh-Gal)$_5$	1.1	LC02-151	
90	Mannitol(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_5$	1.1	LC02-150	
91	Mannitol[Thme(MTzAcNPh-Gal)$_2$]$_5$	1.1	LC02-152	
Glycoclusters à cœur ribose				
				
92	Ribo(proTzAcNPh-Gal)$_3$	1.3	LC03-313	
93	Ribo(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_3$	1.3	LC03-309	
94	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Core type2)$_3$	1.6	4MN37	
95	Ribo(EG$_4$TzMNAc-LNnT)$_3$	1.6	3MN186	

96	Ribo(EG$_4$TzMNAc-4GrB)$_3$	1.6	4MN41	
97	Ribo(EG$_4$TzMNAc-6GrB)$_3$	1.6	4MN33	
98	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Galα1-3Gal)$_3$	1.6	4MN74	
99	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Galα1-4Gal)$_3$	1.6	4MN78	
Galactoclusters à cœur arabinose				
				
100	Ara(proTzAcNPh-Gal)$_3$	1.4	AA23	
101	Ara(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_3$	1.4	AA24	

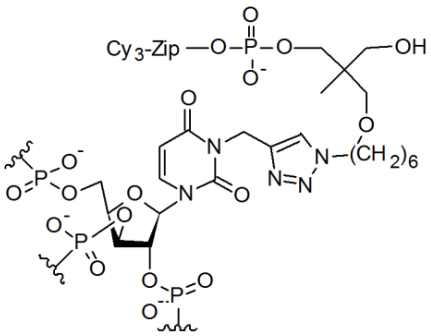
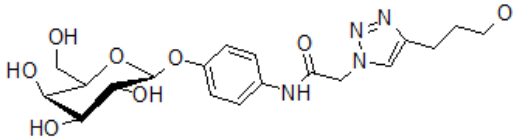
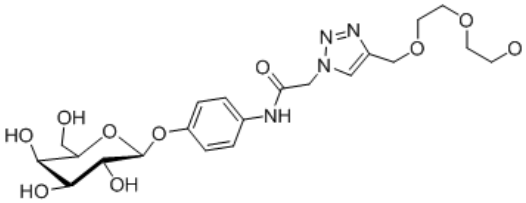
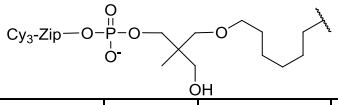
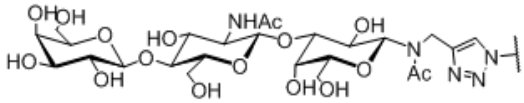
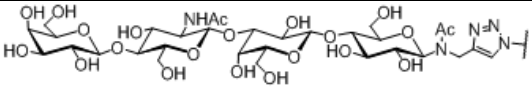
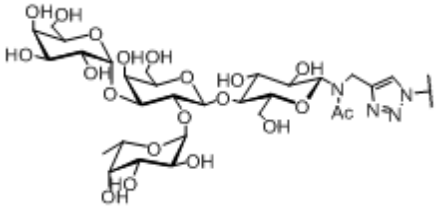
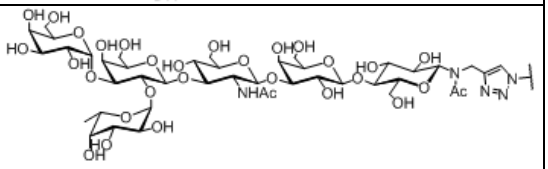
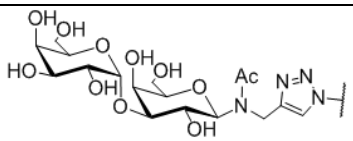
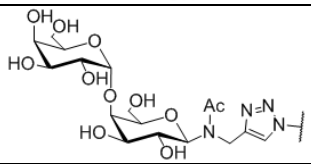
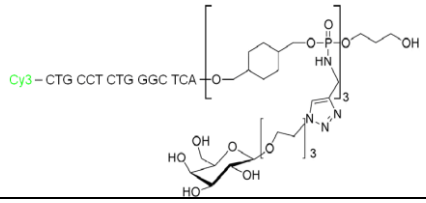
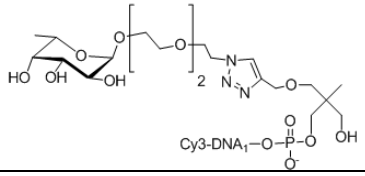
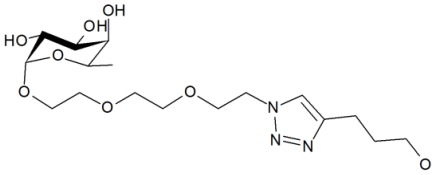
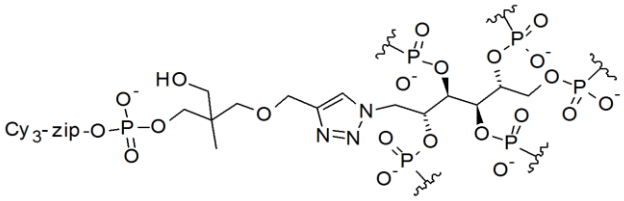
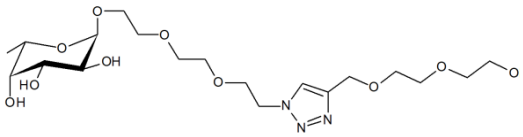
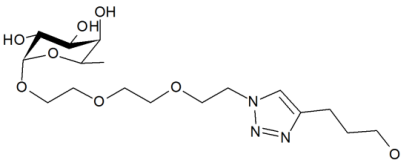
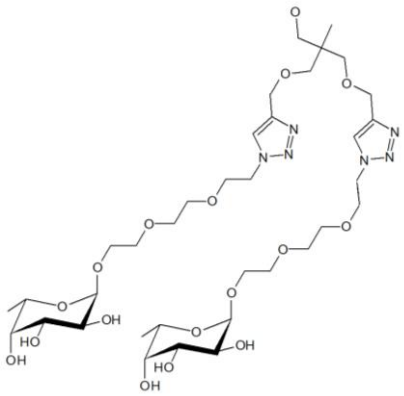
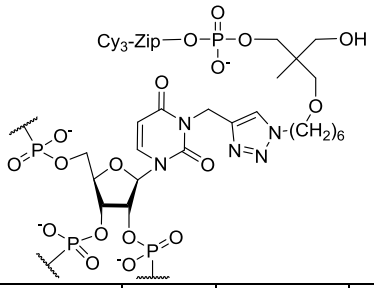
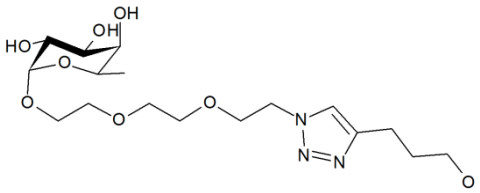
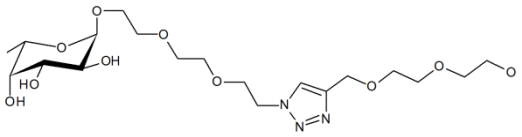
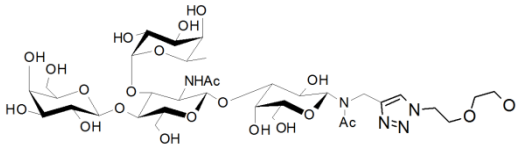
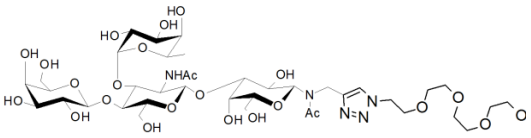
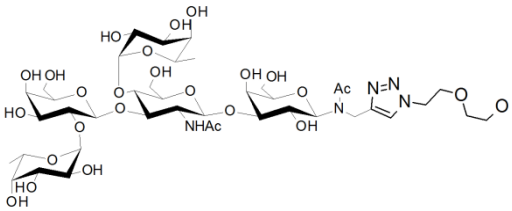
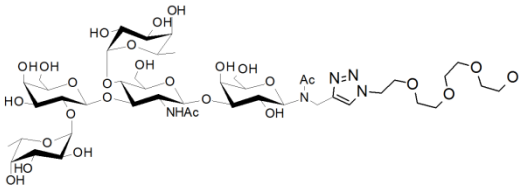
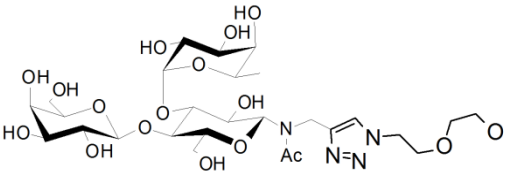
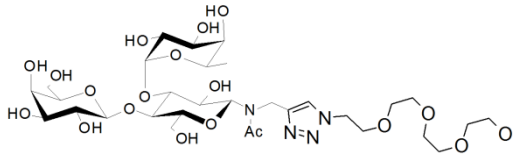
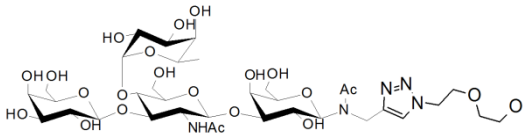
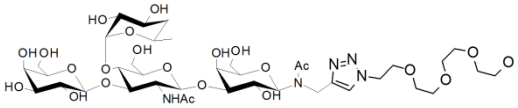
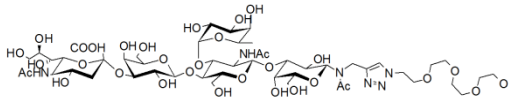
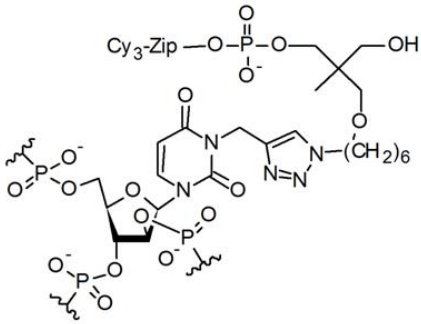
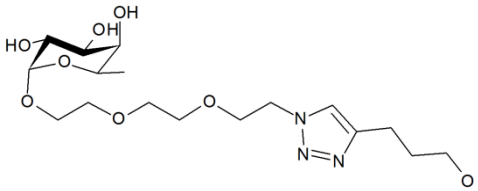
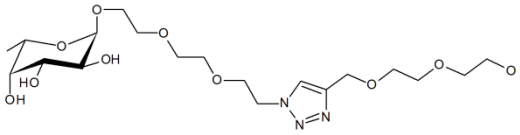
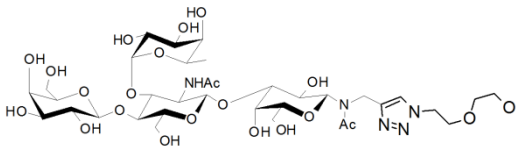
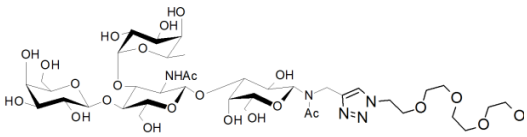
Glycoclusters à cœur xylose				
				
102	Xylo(proTzAcNPh-Gal)$_3$	1.5	AA25	
103	Xylo(EG$_2$MTzAcNPh-Gal)$_3$	1.5	AA26	
Molécules monovalentes à cœur THME				
				
104	THME-HexTzMNAc-Core type2	1.5	4MN36	
105	THME-HexTzMNAc-LNnT	1.5	3MN185	
106	THME-HexTzMNAc-4GrB	1.5	4MN40	
107	THME-HexTzMNAc-6GrB	1.5	4MN32	
108	THME-HexTzMNAc-Galα1-3Gal	1.5	4MN73	
109	THME-HexTzMNAc-Galα1-4Gal	1.5	4MN77	

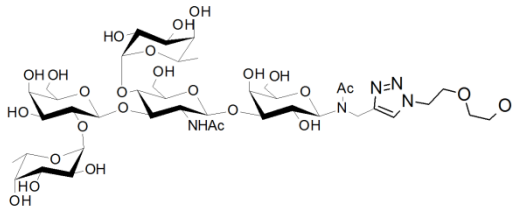
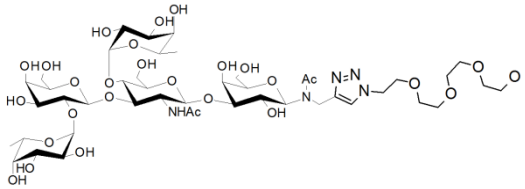
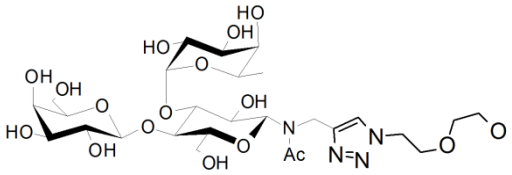
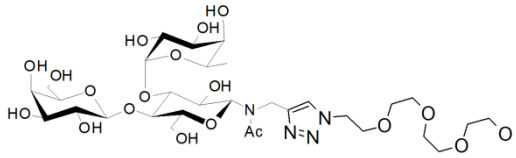
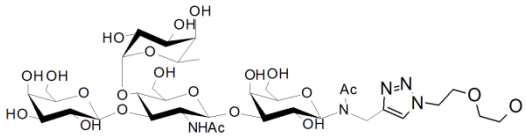
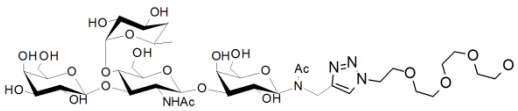
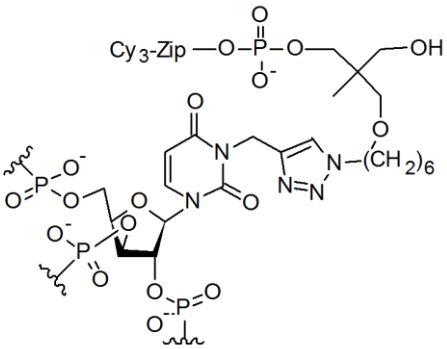
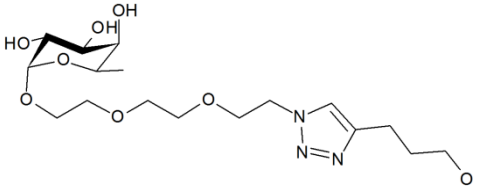
Tableau B-1 : Structures développées des glycoclusters ciblant PA-IL.

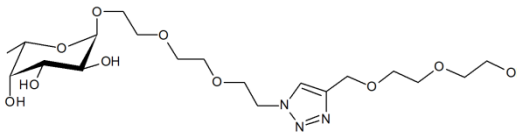
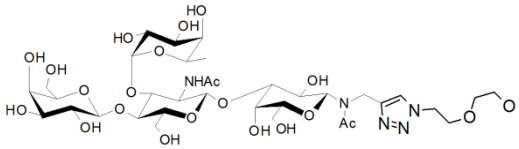
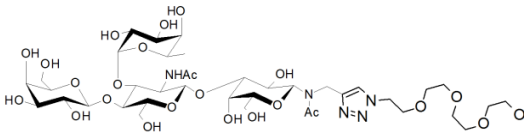
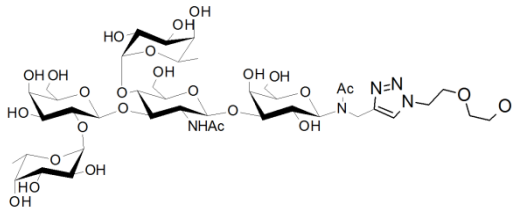
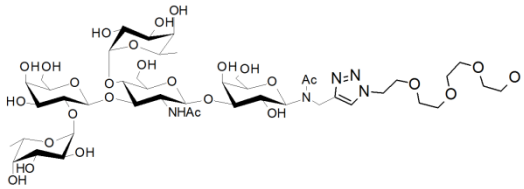
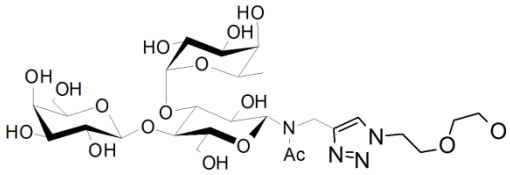
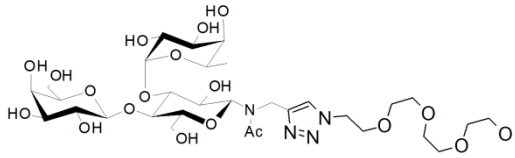
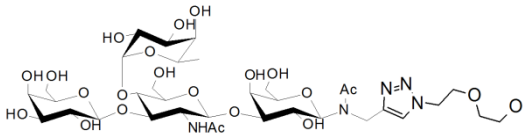
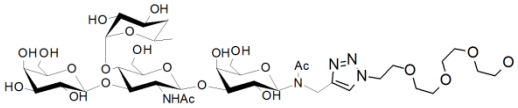
B.2. Glycoclusters ciblant PA-IIL

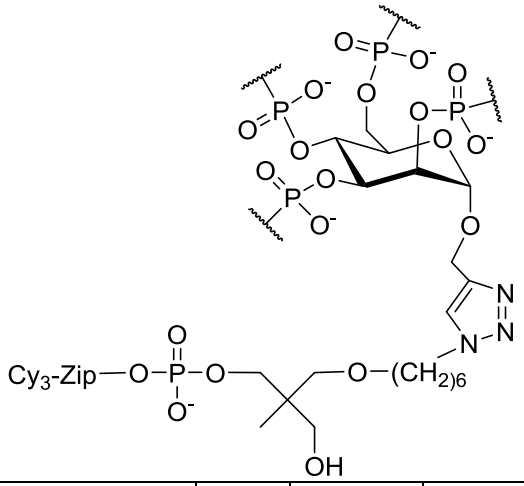
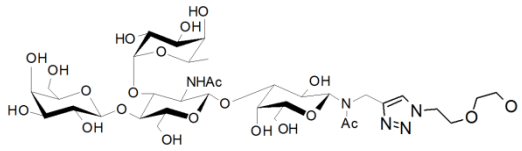
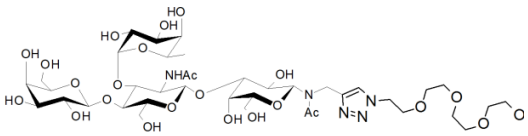
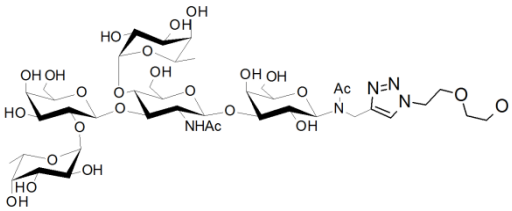
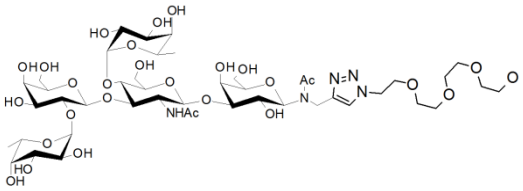
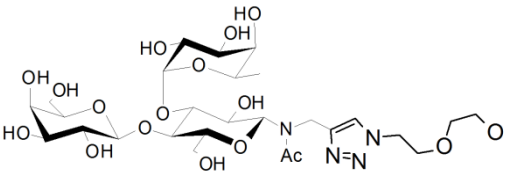
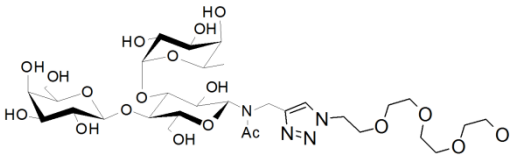
Id.	Nom	ADN	Réf. labo	Structure développée
Témoins				
TN_1	ADN simple brin	1.1	/	/
TN_2	(DMCH-MTzEG$_3$-Gal)$_3$	1.1	CB26C2	
TP_1	Thme-MTzEG$_3$-Fuc	1.1	GW83B	
TP_2	Man(proTzEG$_3$-Fuc)$_4$	1.1	80F	
Glycoclusters à cœur mannitol				
				
110	Mannitol(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.1	LC02-149	
111	Mannitol(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.1	LC02-147	
112	Mannitol[Thme(MTzEG$_3$-Fuc)$_2$]$_5$	1.1	LC02-148	

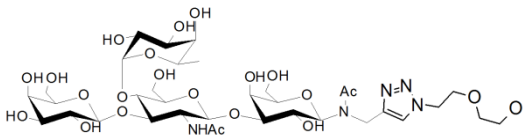
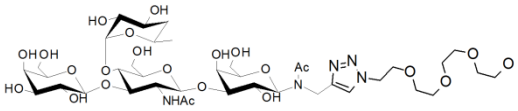
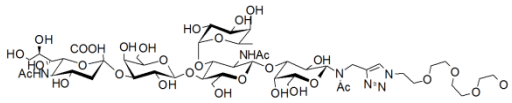
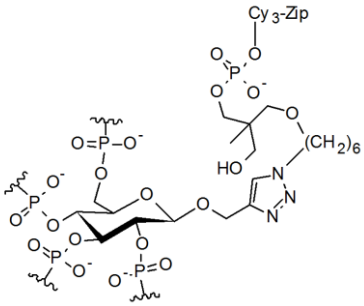
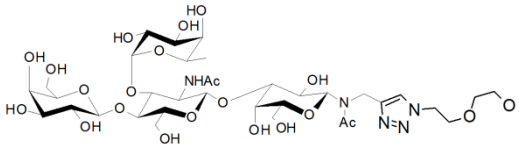
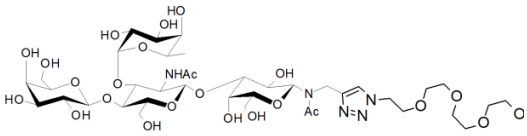
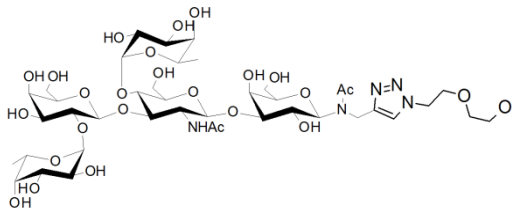
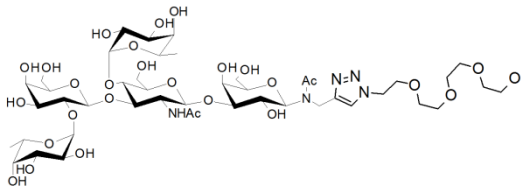
Glycoclusters à cœur ribose				
				
113	Ribo(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.3	LC03-312	
114	Ribo(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.3	LC03-311	
115	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	1.1	4MN66	
116	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	1.3	3MN151	
117	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	1.1	5MN53	
118	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	1.3	3MN160	
119	Ribo(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	1.1	5MN31	

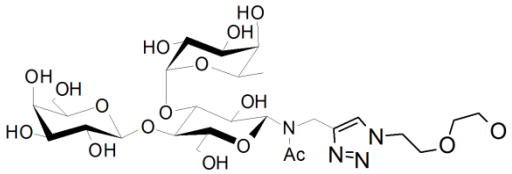
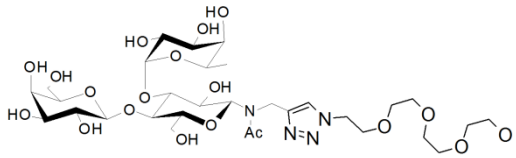
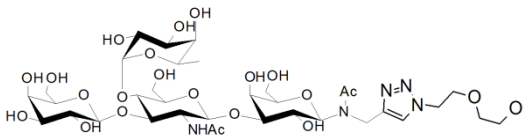
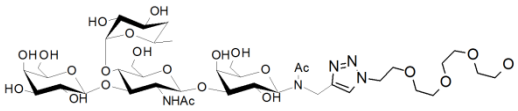
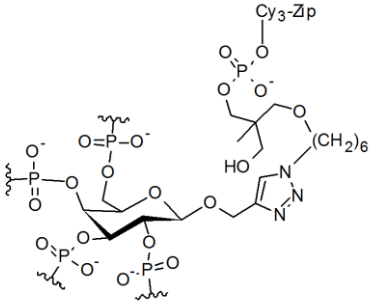
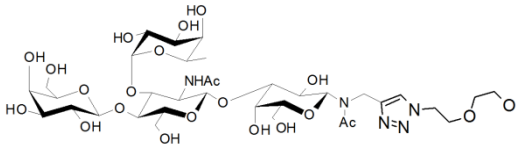
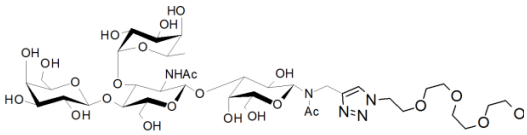
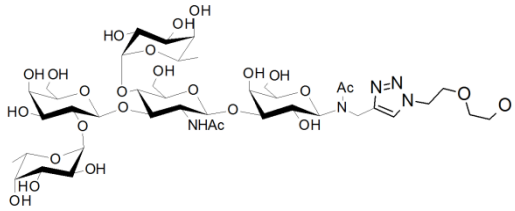
120	Ribo(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_3$	1.6	4MN82	
121	Ribo(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	1.1	4MN56	
122	Ribo(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	1.3	3MN156	
123	Ribo(EG$_4$TzMNAc-sLewis^X)$_3$	1.3	3MN165	
Glycoclusters à cœur arabinose				
				
124	Ara(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.4	AA22	
125	Ara(EG$_2$MTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.4	AA27	
126	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	1.4	4MN62	
127	Ara(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_3$	1.5	4MN63	

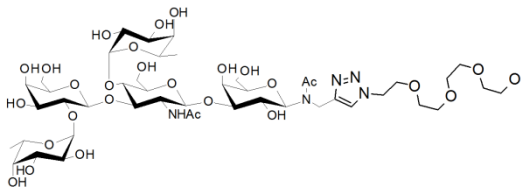
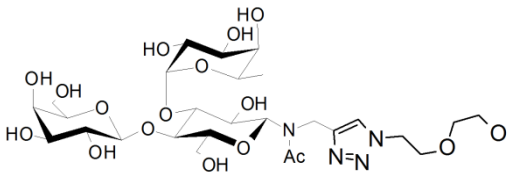
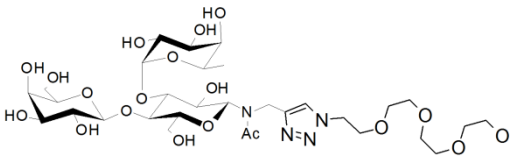
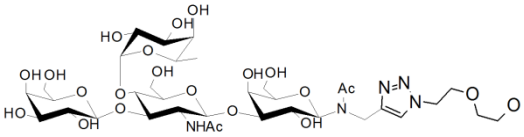
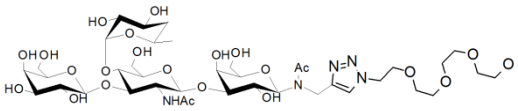
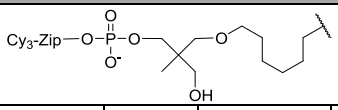
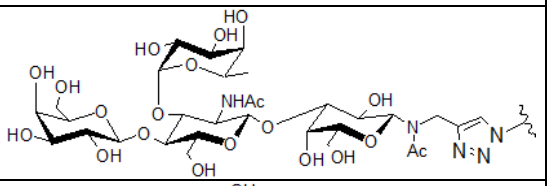
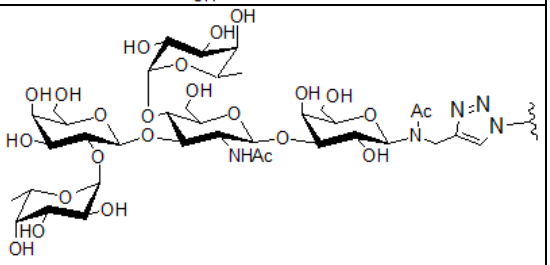
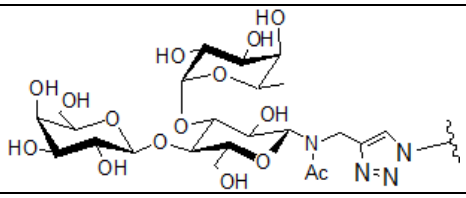
128	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	1.4	5MN51	
129	Ara(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_3$	1.5	5MN52	
130	Ara(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_3$	1.4	5MN32	
131	Ara(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_3$	1.5	5MN43	
132	Ara(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	1.4	4MN52	
133	Ara(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_3$	1.5	4MN53	
Glycoclusters à cœur xylose				
				
134	Xylo(proTzEG$_3$-Fuc)$_5$	1.5	AA28	

135	Xylo(EG_2MTzEG_3-Fuc)$_5$	1.5	AA29	
136	Xylo(EG_2TzMNAc-Lewis^X)$_3$	1.2	4MN64	
137	Xylo(EG_4TzMNAc-Lewis^X)$_3$	1.3	4MN65	
138	Xylo(EG_2TzMNAc-Lewis^B)$_3$	1.2	5MN47	
139	Xylo(EG_4TzMNAc-Lewis^B)$_3$	1.3	5MN48	
140	Xylo(EG_2TzMNAc-3FL)$_3$	1.2	5MN34	
141	Xylo(EG_4TzMNAc-3FL)$_3$	1.3	5MN45	
142	Xylo(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_3$	1.2	4MN54	
143	Xylo(EG_4TzMNAc-Lewis^A)$_3$	1.3	4MN55	

Glycoclusters à cœur mannose				
				
144	Man(EG_2TzMNAc-Lewis^X)$_4$	1.1	4MN71	
145	Man(EG_4TzMNAc-Lewis^X)$_4$	1.4	3MN152	
146	Man(EG_2TzMNAc-Lewis^B)$_4$	1.1	5MN54	
147	Man(EG_4TzMNAc-Lewis^B)$_4$	1.4	3MN161	
148	Man(EG_2TzMNAc-3FL)$_4$	1.1	5MN30	
149	Man(EG_4TzMNAc-3FL)$_4$	1.10	4MN83	

150	Man(EG_2TzMNAc-Lewis^A)$_4$	1.1	4MN61	
151	Man(EG_4TzMNAc-Lewis^A)$_4$	1.4	3MN157	
152	Man(EG_4TzMNAc-sLewis^X)$_4$	1.4	3MN167	
Glycoclusters à cœur glucose				
				
153	Glc(EG_2TzMNAc-Lewis^X)$_4$	1.4	4MN67	
154	Glc(EG_4TzMNAc-Lewis^X)$_4$	1.5	4MN68	
155	Glc(EG_2TzMNAc-Lewis^B)$_4$	1.4	5MN50	
156	Glc(EG_4TzMNAc-Lewis^B)$_4$	1.5	5MN46	

157	Glc(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$	1.4	5MN35	
158	Glc(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_4$	1.5	5MN44	
159	Glc(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	1.4	4MN57	
160	Glc(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	1.5	4MN58	
Glycoclusters à cœur galactose				
				
161	Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	1.2	4MN69	
162	Gal(EG$_4$TzMNAc-Lewis^X)$_4$	1.3	4MN70	
163	Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	1.2	5MN49	

164	Gal(EG$_4$TzMNAc-Lewis^B)$_4$	1.3	5MN56	
165	Gal(EG$_2$TzMNAc-3FL)$_4$	1.2	5MN42	
166	Gal(EG$_4$TzMNAc-3FL)$_4$	1.3	5MN55	
167	Gal(EG$_2$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	1.2	4MN59	
168	Gal(EG$_4$TzMNAc-Lewis^A)$_4$	1.3	4MN60	
Molécules monovalentes à cœur THME				
				
169	THME-HexTzMNAc-Lewis^X	1.2	3MN150	
170	THME-HexTzMNAc-Lewis^B	1.2	3MN159	
171	THME-HexTzMNAc-3FL	1.5	4MN81	

172	THME-HexTzMNAc-Lewis^{A}	1.2	3MN155	
173	THME-HexTzMNAc-sLewis^{X}	1.2	3MN164	

Tableau B-2 : Structures développées des glycoclusters ciblant PA-IIL

B.3. Glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et/ou des *pili*

Id.	Nom	ADN	Réf. labo	Structure développée
Glycoclusters à cœur mannose				
174	Man(EG$_4$TzMNAc-aGM2)$_4$	1.10	4MN30	
175	Man(EG$_2$MTzpro-GalNAcβ1-4Gal)$_4$	1.4	5MN95	
176	Man(EG$_2$TzM-triaose_Lewis^{X})$_4$	1.1	5MN105	

Tableau B-3 : Structures développées des glycoclusters ciblant les lectines du flagelle et/ou des pili de PA.

Les glycoclusters possédant les motifs saccharidiques sLewis^{X}, Lewis^{X} et Lewis^{B}, dans la liste des glycoclusters ciblant PA-IIL, ciblent aussi les lectines du flagelle et des *pili* de PA.

Annexe C Préparation des gels d'électrophorèse et coloration au nitrate d'argent

C.1. Préparation des gels d'électrophorèse

Il est utilisé le matériel Biorad (Réf. 1658017) pour couler des gels d'1 mm d'épaisseur entre deux plaques de verre. Les plaques de verre et le peigne servant à la formation des puits sont préalablement lavés avec de l'eau ultrapure et séchés à l'éthanol. Le gel de séparation à 8 ou 15 % d'acrylamide est préparé et immédiatement coulé entre les deux plaques de verre jusqu'à 2 cm avant le haut des plaques de verre. Il est ensuite ajouté 1 mL d'isopropanol afin d'avoir une ligne parfaitement horizontale. Puis, il faut vérifier que le montage ne fuit pas et attendre que le gel polymérise. Pour cela, le tube ayant servi à la préparation du gel peut servir de témoin de polymérisation. L'isopropanol est ensuite retiré et le gel de concentration à 5 % d'acrylamide est préparé. Il est immédiatement coulé au dessus du gel de séparation et le peigne est placé entre les deux plaques de verre afin de former les puits. Il faut ensuite attendre que le gel de concentration polymérise, puis le peigne peut être retiré. Le gel d'électrophorèse ainsi préparé est alors placé dans la cuve de migration contenant le tampon de migration. L'électrophorèse se fait dans les conditions décrites dans le § 2.4.1.2.

Le tableau C-1 décrit la préparation des gels de concentration et de séparation.

	Gel de concentration à 5 % d'acrylamide (5 mL)	**Gel de Séparation à 8 % d'acrylamide (15 mL)**	**Gel de Séparation à 15 % d'acrylamide (15 mL)**
H_2O	7,38 ou 7,28	8,05 ou 7,9	5,40 ou 5,25
1,0 M TRIS, pH 6.8	1,26	/	/
1,5 M TRIS, pH 8.8	/	3,8	3,8
40 % Acrylamide mix	1,25	3,0	5,625
10 % SDS	0 ou 0,1	0 ou 0,15	0 ou 0,15
10 % APS	0,1	0,15	0,15
TEMED	0,01	0,009	0,006

Tableau C-1 : Composition des gels d'électrophorèse avec le volume nécessaire pour faire deux gels à 8 et à 15 % d'acrylamide. Les produits sont ajoutés dans l'ordre d'apparition dans le tableau et le SDS est rajouté seulement pour les électrophorèses en conditions dénaturantes.

C.2. Coloration au nitrate d'argent

Après avoir effectué la migration des protéines et pris une photo du gel d'électrophorèse grâce à l'appareil imageur IS4000M de KODAK et un filtre d'excitation à 635 nm afin de visualiser le marquage des protéines à l'Alexa647, une coloration au nitrate d'argent du gel est réalisée. Elle permet de colorer toutes les protéines présentes dans le gel. Pour cela, les gels sont plongés dans une solution de fixation (30 % éthanol, 10 % acide acétique) pendant une nuit. Ils sont ensuite lavés avec 20 % d'éthanol pendant 10 minutes puis, trois fois 5 minutes avec de l'eau ultrapure (18.2 MΩ). Les gels sont ensuite immergés pendant 1 minute dans une solution de sensibilisation (0.02 % thiosulfate de sodium) et rincés deux fois 20 secondes avec de l'eau ultrapure. Ils sont ensuite incubés pendant 30 minutes avec une solution de nitrate d'argent à 0.1 % à l'abri de la lumière. Les gels sont rapidement rincés à l'eau ultrapure et plongés dans la solution de développement (0.04 % formaldéhyde, 2 % carbonate de sodium) et agités jusqu'à la révélation des bandes. La révélation est ensuite stoppée avec 10 % d'acide acétique et les gels sont lavés deux fois 10 minutes avec de l'eau ultrapure. Enfin, une photo des gels est prise.

Annexe D Méthode permettant de mesurer un K_d sur microarray

L'interaction entre un glycocluster (G) et une lectine (L) peut être décrite par l'équation suivante :

$$L + G \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} LG$$

Où k_{on} et k_{off} correspondent respectivement aux taux d'association et de dissociation du complexe LG (Nombre d'évènement d'association ou dissociation par unité de temps).

A l'équilibre, le taux d'association et de dissociation sont équivalents, il peut alors être écrit :

$$[L].[G].k_{on} = [LG].k_{off}$$

$$\frac{[L].[G]}{[LG]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d$$

Où [L] et [G] correspondent respectivement aux concentrations en lectine et glycocluster libre, [LG] à la concentration du complexe LG et K_d la constante de dissociation en l'équilibre.

Si l'on considère que l'on est en excès de lectine par rapport au glycocluster, il peut être écrit :

$$[L] = [L]_{TOT} - [LG] \approx [L]_{TOT}$$

$$[G] = [G]_{TOT} - [LG]$$

Où $[L_{TOT}]$ et $[G_{TOT}]$ correspondent respectivement aux concentrations en lectine et glycocluster totales (libre + complexe).

Il peut alors être écrit :

$$K_d = \frac{([G_{TOT}] - [LG]).[L_{TOT}]}{[LG]}$$

Cette équation équivaut à :

$$\frac{[L_{TOT}]}{[LG]} = \frac{1}{[G_{TOT}]}.[L_{TOT}] + \frac{K_d}{G_{TOT}}$$

Il peut ensuite être considéré que G_{TOT}, qui correspond à la concentration totale en glycocluster et qui est présente en concentration limitante par rapport à celle de la lectine,

reflète la capacité maximale d'interaction du glycocluster avec la lectine. G_{TOT} est ainsi relié au signal de fluorescence maximal (FI_{max}) observé pour le complexe glycocluster/Alexa647_lectine. De plus, [LG] correspond à la concentration du complexe glycocluster/Alexa647_lectine, il est relié au signal de fluorescence émis pour une concentration donnée en lectine (FI). Il peut donc être écrit :

$$\frac{[Lectine]}{FI} = \frac{1}{FImax} \cdot [lectine] + \frac{Kd}{FImax}$$

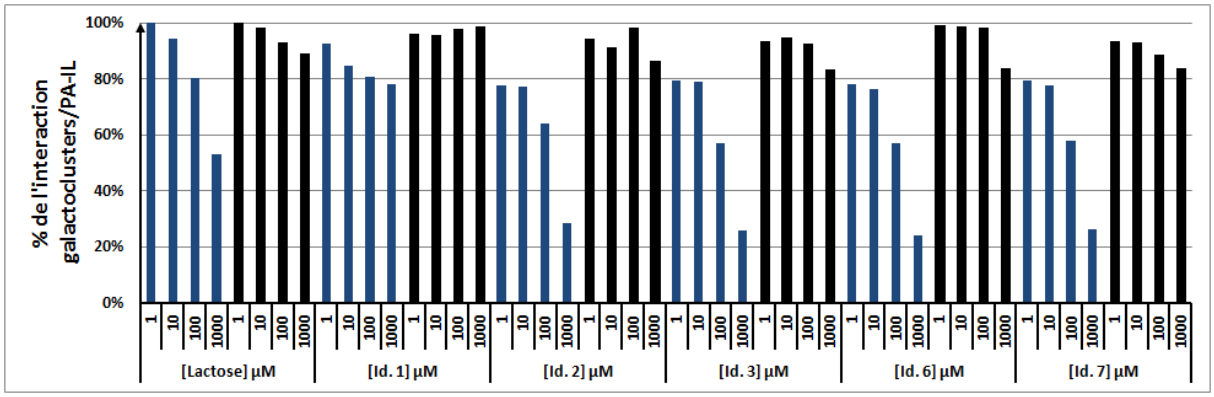
De plus, nous venons de voir que :

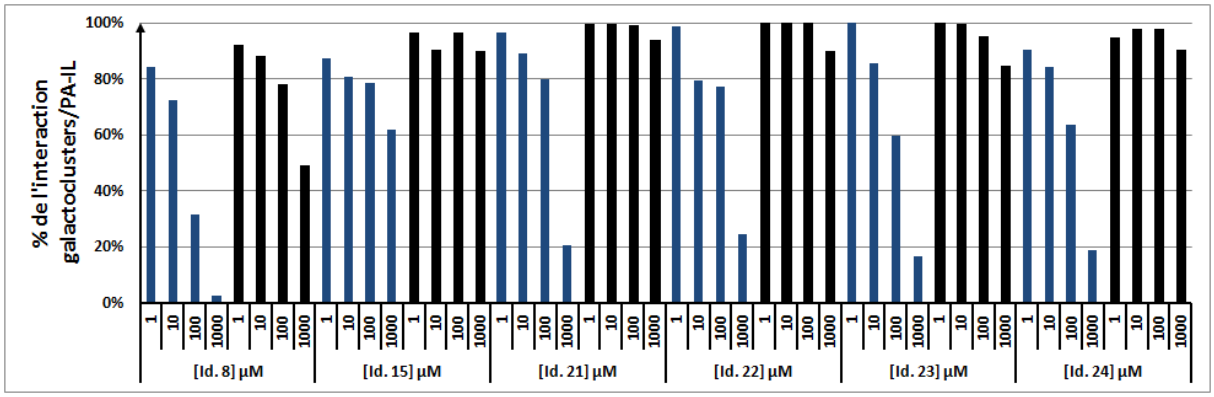
$$\frac{[LG]}{[G_{TOT}]} = \frac{[L_{TOT}]}{K_d + [L_{TOT}]}$$

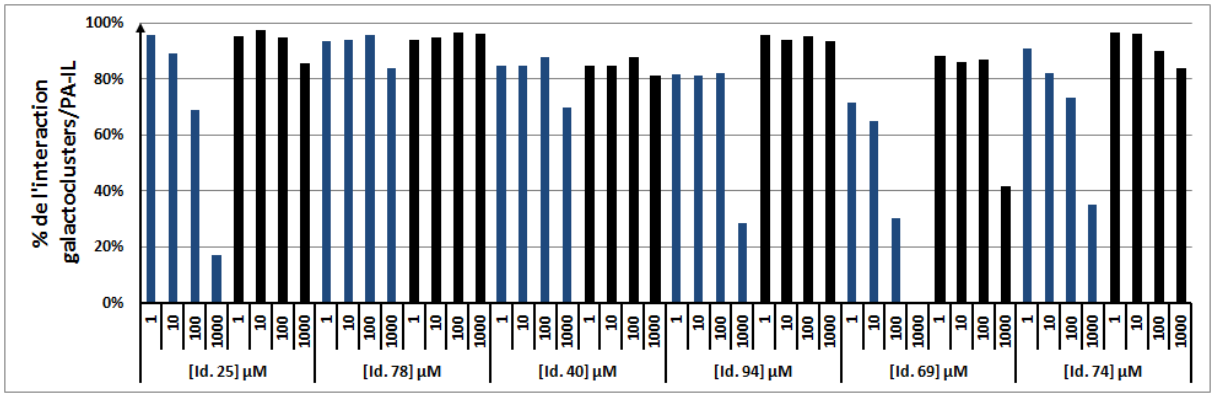
Puisque G_{TOT}, est considéré comme la capacité maximale d'interaction du glycocluster avec la lectine, le rapport $\frac{[LG]}{[G_{TOT}]}$ représente la fraction de glycoclusters interagissant avec la lectine. Ainsi lorsque, K_d = $[L_{TOT}]$, la fraction est égale à 50 % ce qui signifie que la moitié des glycoclusters interagissent avec la lectine.

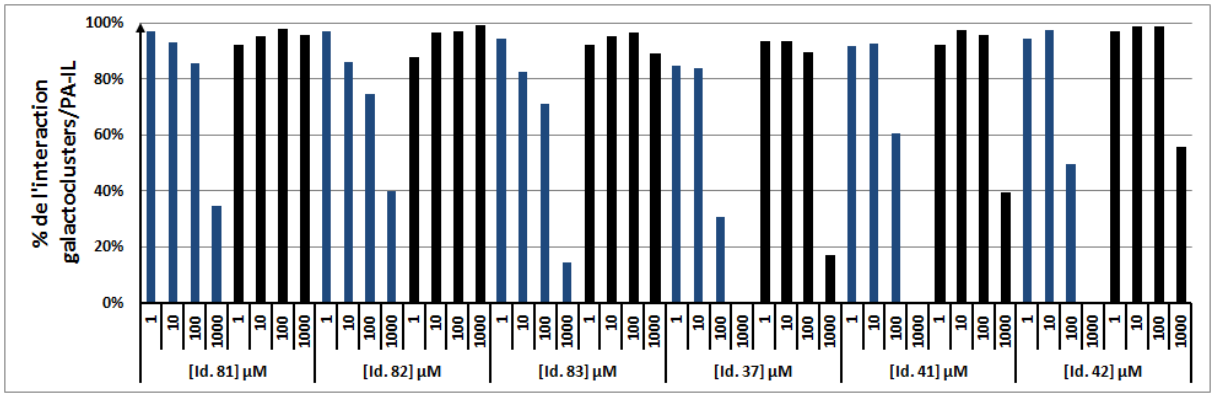
Annexe E Résultats du criblage de la bibliothèque de sucres

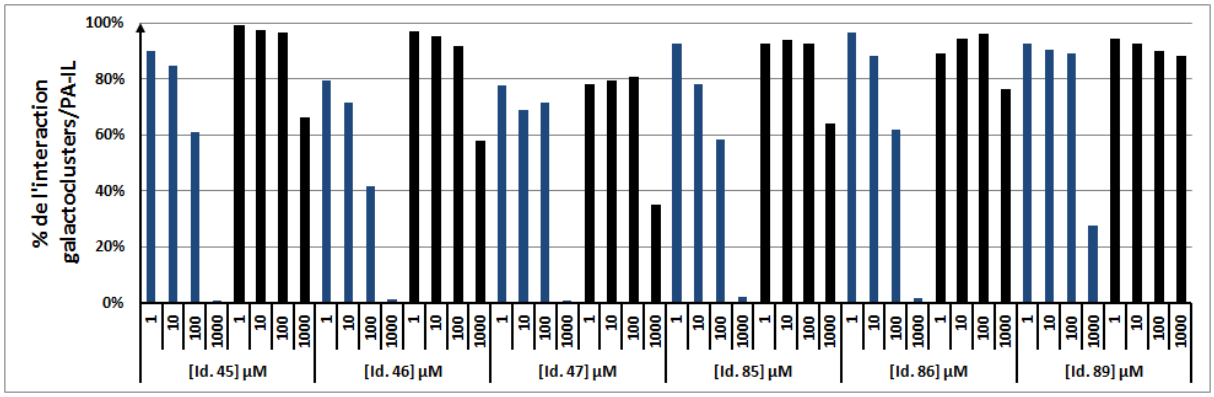
E.1. Sucres positifs au criblage vis-à-vis de PA-IL

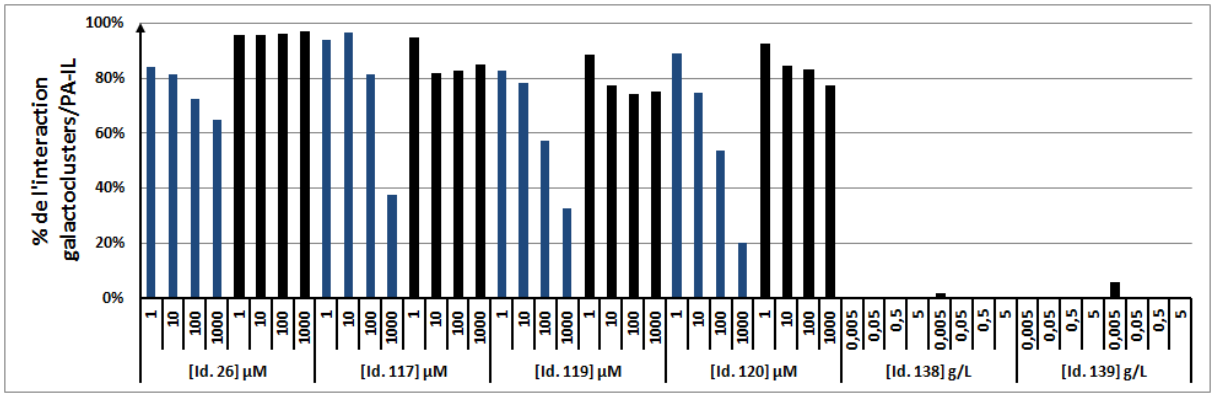


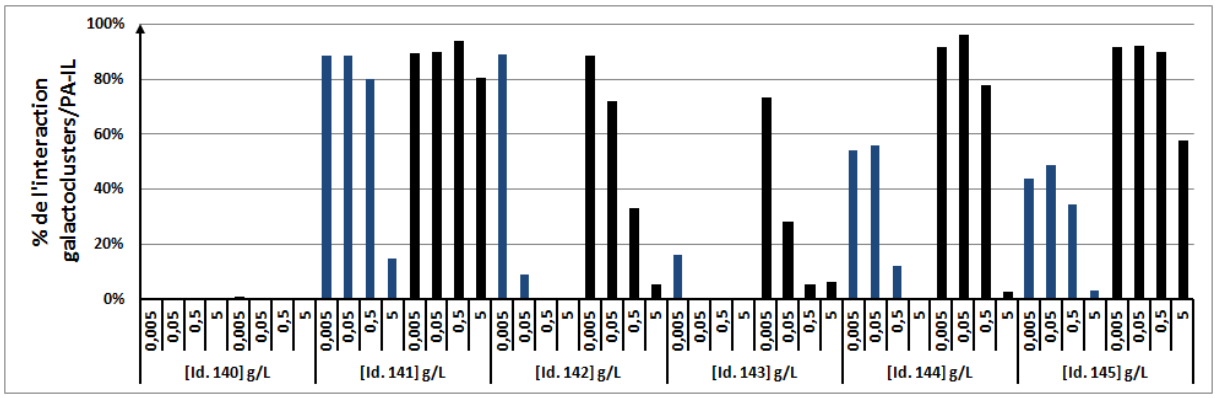





% de l'interaction galactoclusters/PA-IL
100%
80%
60%
40%
20%
0%
[Id. 81] µM
[Id. 82] µM
[Id. 83] µM
[Id. 37] µM
[Id. 41] µM
[Id. 42] µM


% de l'interaction galactoclusters/PA-IL
100%
80%
60%
40%
20%
0%
[Id. 45] µM
[Id. 46] µM
[Id. 47] µM
[Id. 85] µM
[Id. 86] µM
[Id. 89] µM


% de l'interaction galactoclusters/PA-IL
100%
80%
60%
40%
20%
0%
[Id. 26] µM
[Id. 117] µM
[Id. 119] µM
[Id. 120] µM
[Id. 138] g/L
[Id. 139] g/L


% de l'interaction galactoclusters/PA-IL
100%
80%
60%
40%
20%
0%
[Id. 140] g/L
[Id. 141] g/L
[Id. 142] g/L
[Id. 143] g/L
[Id. 144] g/L
[Id. 145] g/L

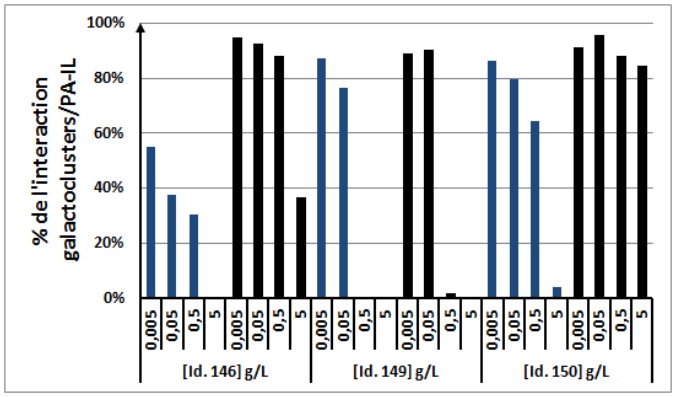


Figure E-1 : Histogrammes représentant le potentiel d'inhibition de l'interaction galactoclusters de référence G_{moyen} (bleu) et G_{fort} (noir) avec PA-IL par les sucres de la bibliothèque dont le criblage avait montré une affinité vis-à-vis de PA-IL.

	Famille	Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Oligosaccharides produits par fermentation bactérienne	**Core Structure**	Type I	Galβ-3GlcNAcβ-4Gal	D	1	GLY005
			Galβ-3GlcNAc	C^-	3	GLY009
		Type II	Galβ-4GlcNAcβ-4Gal	C^-	2	GLY006
			Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C^-	6	GLY021
			Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_2$Glc	C^-	7	GLY022
			Galβ1-4(GlcNAcβ1-3Galβ1-4)$_3$Glc	B	8	GLY023
	Ag des groupes sanguins (système ABO)	Antigènes A	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal	D	15	GLY034
		Antigènes B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4Glc	C	21	GLY038-3
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	C	22	GLY039-1
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	C	23	GLY039-2
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	24	GLY040-1
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	25	GLY040-2
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	D	78	GLY129
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	40	GLY068
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	D	94	GLY165
	Oligosacch-Globosides (Ag P)	Ag P^k (Gb3)	Galα1-4Galβ1-4Glc	B	69	GLY120
		Globo-B	Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	D	74	GLY125
		Ag Forssman	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	D	81	GLY132
			GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Gal	D	82	GLY133
			GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	C	83	GLY134
	Oligosacch-Galα1-3Gal	Fucosylés	Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	37	GLY064
		Isogloboseries	Galα1-3Galβ1-4Glc	B	41	GLY070
		Ag Galili et Xeno	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	B	42	GLY071
			Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_2$Galβ1-4Glc	B	45	GLY077
			Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_3$Galβ1-4Glc	B	46	GLY078
			Galα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)$_4$Galβ1-4Glc	B	47	GLY079
	Divers	Disaccharides	Galα1-3Gal	B	85	GLY153
			Galα1-4Gal	B	86	GLY154
		Galactosyl-lactose	Galβ1-4Glcβ1-1βGal	D	89	GLY160
		Antigène Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	D	26	GLY050

Oligo- et polysaccharides issus de la biomasse	**Glucanes**	Xyloglucanes	oligosaccharides avec environ 80 % GXLF	D	117	GLU1000
			oligosaccharides avec environ 60% de XXFG	D	119	GLU1150
			oligosaccharides avec environ 60% de XLFG	D	120	GLU1160
	Mannanes	Galactomannanes	[Manβ1-4(Galα1-6)Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 2:1	A	138	MAN200
			[Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1	A	139	MAN201
			[(Galα1-6)Manβ1-4[(Galα1-6)Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 1:1	A	140	MAN202
			[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 3.	A	141	MAN213
			[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 5.	A	142	MAN215
			[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP ≈ 9.	A	143	MAN219
			Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Manβ1-4Man	A	144	MAN300
			[Manβ1-4 Manβ1-4(Galα1-6)Manβ1-4Man]$_n$, Ratio$_{Man/Gal}$ ≈ 4:1, DP = 3.	A	145	MAN400
			Manβ1-4Manβ1-4(Galα1-6)Man	A	146	MAN500
		Faux-positifs	D-mannose lié en β(1-4)	/	149	MAN800
			D-mannose lié en β(1-4) partiellement O-acetylé	/	150	MAN801

Tableau E-1 : Tableau récapitulatif de tous les sucres de la bibliothèque dont le criblage a révélé une interaction avec PA-IL.

E.2. Sucres positifs au criblage PA-IIL

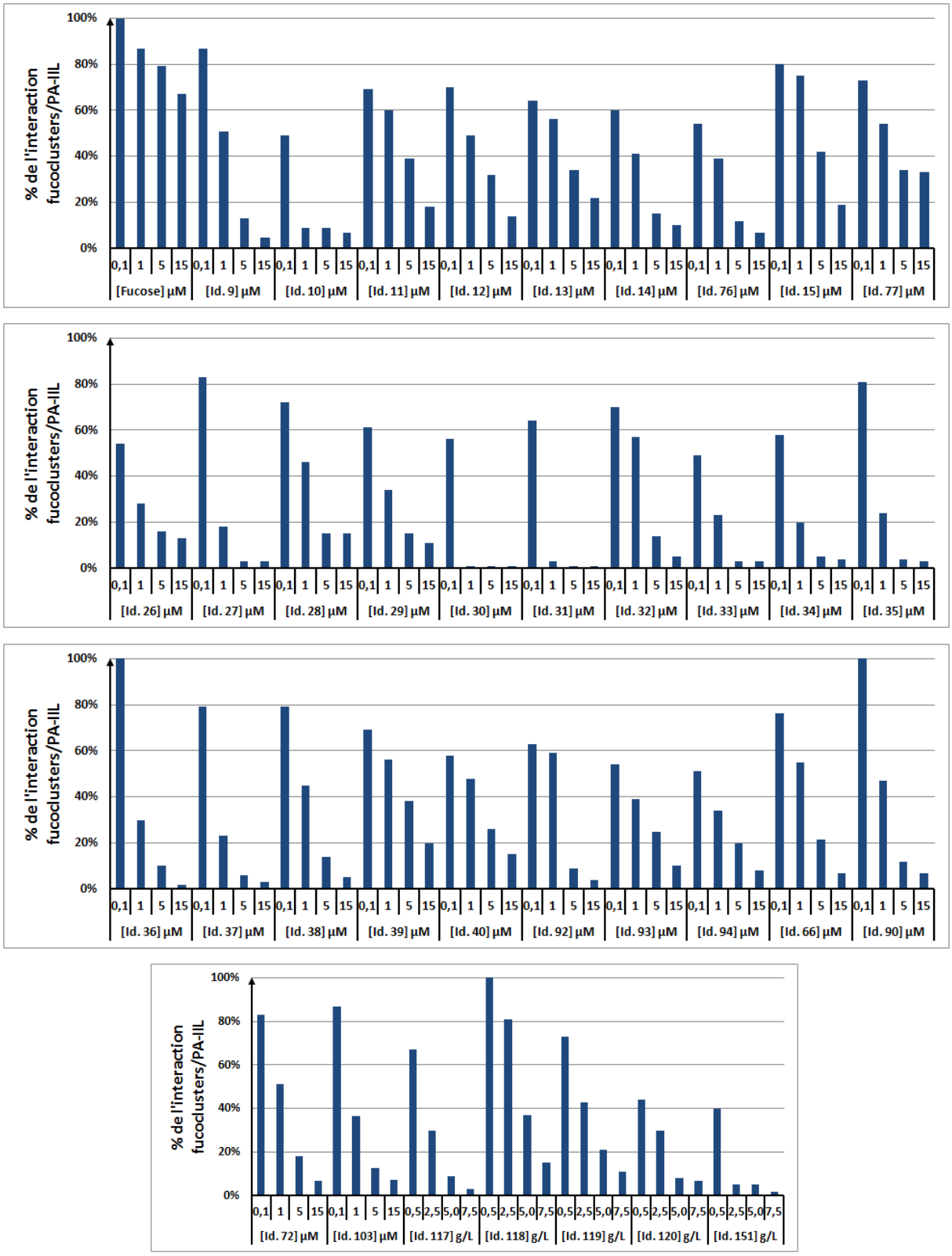


Figure E-2 : Histogrammes représentant le potentiel d'inhibition de l'interaction fucocluster de référence G_{moyen} avec PA-IIL par les sucres de la bibliothèque dont le criblage avait montré une affinité vis-à-vis de PA-IIL.

	Famille	Sous-Famille	Structure	Note	Id.	Réf.
Oligosaccharides produits par fermentation bactérienne	**Ag des groupes sanguins (système ABO)**	Antigènes H	Fucα1-2Gal	C	9	GLY030
			Fucα1-2Galβ1-4Glc	C	10	GLY031-3
			Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal	D	11	GLY032-1
			Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal	D	12	GLY032-2
			Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	D	13	GLY033-1
			Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	C	14	GLY033-2
			Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	C	76	GLY127
		Antigènes A	GalNAcα1-3(Fucα1-2)Gal	D	15	GLY034
			GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal	D	77	GLY128
	Ag Lewis	Antigènes Le^X	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	26	GLY050
			Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	27	GLY051
		Antigène Le^Y	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	28	GLY052
		Antigène sLe^X	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Gal	C	29	GLY053
		Antigènes Le^A	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	A	30	GLY054
			Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	A	31	GLY055
		Antigène Le^B	Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-3Gal	C	32	GLY056
	Oligosacch-fucosylés	" 3-FL core"	Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	33	GLY060
			Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	34	GLY061
			Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	35	GLY062
			Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	36	GLY063
			Galα1-3Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	B	37	GLY064
		" 2’3DFL core"	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	C	38	GLY066
			GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	39	GLY067
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-3)Glc	D	40	GLY068
		" 2’2DFL core"	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	C	92	GLY163
			GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	D	93	GLY164
			Galα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4(Fucα1-2)Glc	D	94	GLY165
	Divers	Fuc-GM1	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc	D	66	GLY103
		DiFucosyl-pentaose	Fucα1-2Galβ1-4Glcβ1-1βGalα2-1Fuc	C	90	GLY161
		Globo-H	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc	C	72	GLY123
		iGbH analogue	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glc	D	103	GLY201-1

Oligo- et polysaccharides issus de la biomasse	**Glucanes**	Xyloglucanes	oligosaccharides avec environ 80 % GXLF	C	117	GLU1000
			oligosaccharides avec environ 80% de XFG	D	118	GLU1110
			oligosaccharides avec environ 60% de XXFG	D	119	GLU1150
			oligosaccharides avec environ 60% de XLFG	C	120	GLU1160
	Mannanes	Mannane	Polysaccharide de D-mannose relié en α(1-6) et fortement ramifié avec une chaine du D-Mannose en α(1-2) et α(1-3)	A	151	MAN802

Tableau E-2 : Tableau récapitulatif de tous les sucres de la bibliothèque dont le criblage a révélé une interaction avec PA-IIL.

Annexe F Autres résultats concernant les interactions glycocluster/lectine obtenus sur microarray

F.1. Résultats concernant la lectine PA-IL

F.1.1. Galactoclusters possédant différentes topologies

La topologie du glycocluster est un point clé pour permettre une présentation optimale des galactoses aux sites de reconnaissance présents sur PA-IL. Dans l'idéal pour obtenir une interaction maximale glycocluster/lectine, la topologie du glycocluster doit permettre une orientation des bras et une distance inter-galactose correspondant parfaitement, à l'échelle atomique, à la topologie des sites de reconnaissance de la lectine. La synthèse des glycoclusters étant empirique, ce type de topologie est très difficilement atteignable. Bien que cela implique un coût entropique lors de l'interaction, de la flexibilité est introduite à la structure du glycocluster (cœur, linker,…) afin de lui permettre de s'adapter aux sites de reconnaissance présents sur la lectine. La topologie du glycocluster est principalement dirigée par le choix du cœur.

Galactoclusters étudiés

Les 14 galactoclusters étudiés ici varient en fonction de leur cœur et de la valence qui y est associée. Ils présentent tous un linker 1 aliphatique (L1 = M ou Pro ou EG_2M) et un linker 2 aromatique type phényle (L2 = AcNPh). Différents cœurs permettant quatre différentes topologies ont été étudiés :

- Le cœur DMCH pour une présentation linéaire et en peigne de 3 à 5 bras portant les galactoses (Figure F-1a)
- Le cœur Mannitol pour une présentation linéaire, alternée et en couronne de 5 à 10 bras portant les galactoses (Figure F-1b)
- Le cœur Mannose (Hexose) pour une présentation centrée de 4 bras portant les galactoses (Figure F-1c)
- Les cœurs Arabinose, Xylose et Ribose (Pentose) pour une présentation centrée de 3 bras portant les galactoses (Figure F-1d)

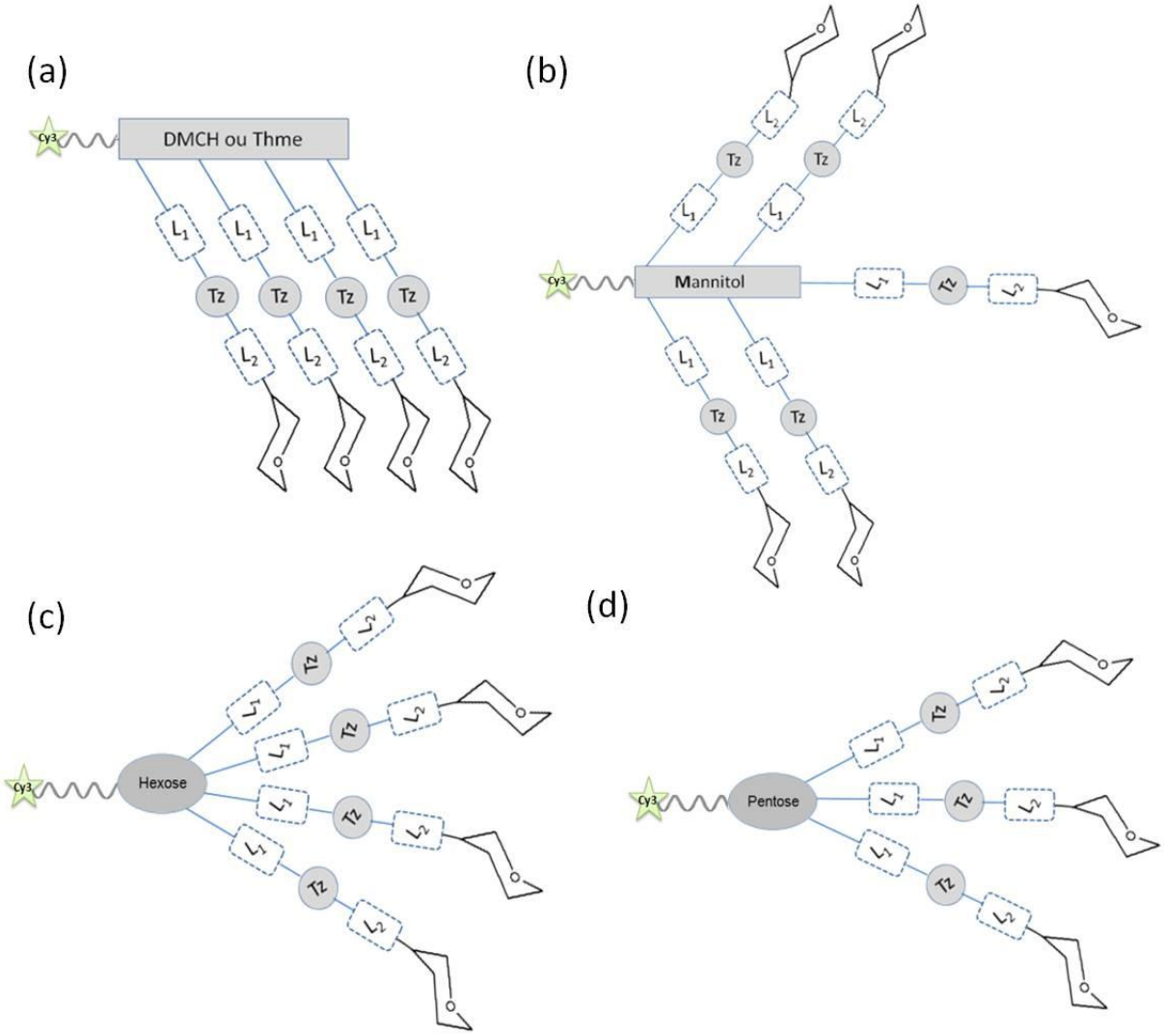


Figure F-1 : Représentation schématique des différentes topologies étudiées : linéaire en peigne (a), linéaire alternée (b), centrée de valence 4 (c) et centrée de valence 3 (d).

Les noms des galactoclusters étudiés sont présentés dans le tableau F-1.

Id.	Nom	Cœur	L1TzL2	Valence
86	(**DMCH**-**M**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	DMCH	MTzAcNPh	3
87	(**DMCH**-**M**Tz**AcNPh**-Gal)$_4$	DMCH	MTzAcNPh	4
88	(**DMCH**-**M**Tz**AcNPh**-Gal)$_5$	DMCH	MTzAcNPh	5
89	**Mannitol**(**pro**Tz**AcNPh**-Gal)$_5$	Mannitol	proTzAcNPh	5
90	**Mannitol**(**EG$_2$M**Tz**AcNPh**-Gal)$_5$	Mannitol	EG$_2$MTzAcNPh	5
91	**Mannitol**[Thme(**M**Tz**AcNPh**-Gal)$_2$]$_5$	Mannitol	MTzAcNPh	10
92	**Ribo**(**pro**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	Ribo	proTzAcNPh	3
93	**Ribo**(**EG$_2$M**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	Ribo	EG$_2$MTzAcNPh	3
100	**Ara**(**pro**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	Ara	proTzAcNPh	3
101	**Ara**(**EG$_2$M**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	Ara	EG$_2$MTzAcNPh	3
102	**Xylo**(**pro**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	Xylo	proTzAcNPh	3
103	**Xylo**(**EG$_2$M**Tz**AcNPh**-Gal)$_3$	Xylo	EG$_2$MTzAcNPh	3
G2	**Man**(**pro**Tz**AcNPh**-Gal)$_4$	Man	proTzAcNPh	4
15	**Man**(**EG$_2$M**Tz**AcNPh**-Gal)$_4$	Man	EG$_2$MTzAcNPh	4

Tableau F-1 : Galactoclusters étudiés.

Etude d'affinité sur le glycocluster-microarray

Cette étude d'affinité de différentes topologies de galactoclusters s'inscrit dans la suite des travaux effectués pendant la thèse du Dr. Alice Goudot où une première évaluation de leur affinité avait été faite par des mesures de fluorescence et d'IC_{50} sur le microarray. Cette étude a été complétée par une mesure de la valeur de la constante de dissociation (K_d) sur le microarray (Figure F-2).

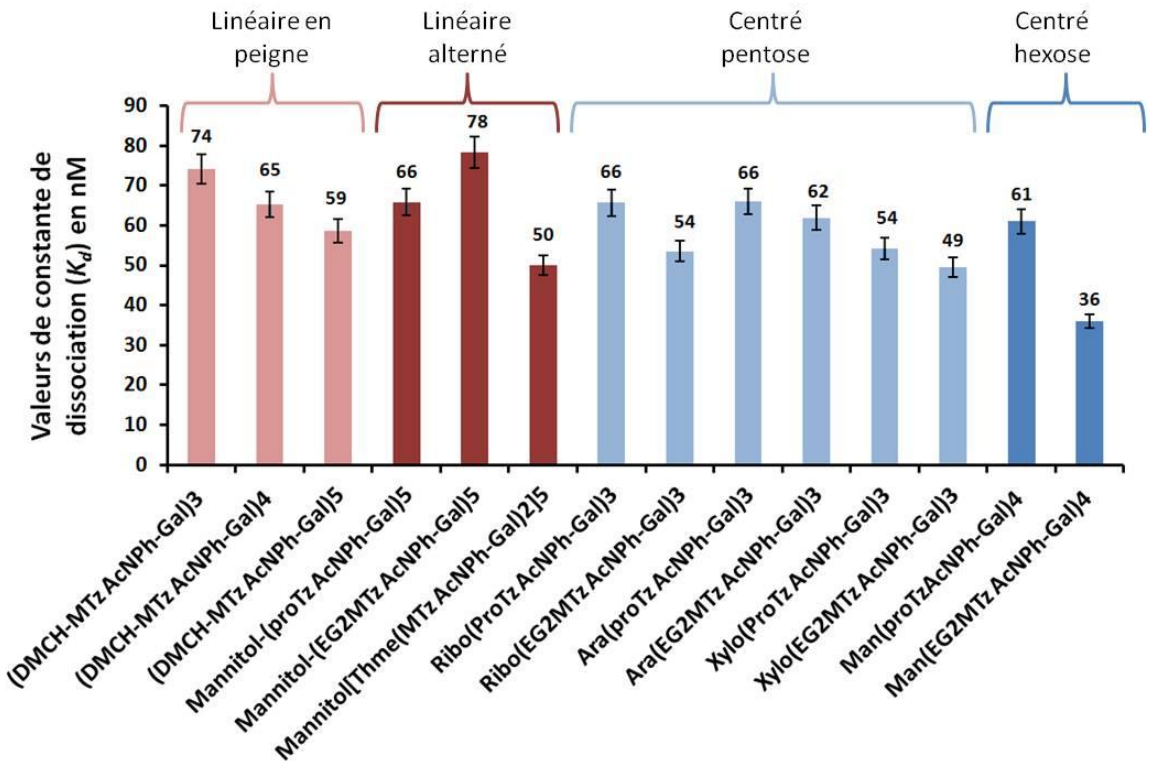


Figure F-2 : Constante de dissociation des différents galactoclusters étudiés ici. Les barres d'erreur représentent une erreur de 10 %.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la thèse du Dr. Alice Goudot (Gerland et al., 2014) et sont en partis publiés (Casoni et al., 2014; Ligeour et al., 2015a).

De manière générale, les galactoclusters possédant un linker 1 plus flexible, EG_2M, possèdent plus d'affinité pour PA-IL que ceux possédant le linker 1 type pro.

Pour les glycoclusters à cœur linéaire en peigne ou alterné, l'augmentation de la valence permet une diminution du K_d et donc favorise l'interaction avec PA-IL. Néanmoins, cette augmentation d'affinité ne semble pas pouvoir être attribuée à un effet chélate mais plutôt à une augmentation locale de la concentration en galactose.

Pour une même valence de 3, les cœurs type pentose permettent d'obtenir un K_d plus bas que le cœur linéaire en peigne. De même, le cœur hexose mannose (valence de 4) permet d'obtenir un K_d plus bas que le cœur linéaire alterné mannitol (valence de 5). La présentation centrée des galactoclusters est donc plus favorable que celle en peigne. Les galactoclusters à cœur pentose possèdent tous des K_d similaires autour de 50-65 nM avec une préférence pour le cœur xylose puis ribose et enfin arabinose.

Enfin, le meilleur des galactoclusters est le Man(EG_2MTzAcNPh-Gal)$_4$ avec un K_d de 36 nM.

F.1.2. Galactoclusters linéaires tétravalents avec différents linkers 2 aromatiques

Dans le chapitre 5 de cette thèse, il a été discuté l'influence de différents linkers 2 aromatiques portés par des galactoclusters à cœur mannose ainsi que la présence d'une liaison phosphorothioate ou *S*-Gal. Il va être présenté, ici, l'influence de ces différents paramètres sur des galactoclusters à cœur linéaire DMCH.

Galactoclusters étudiés

Les 16 galactoclusters étudiés présentent tous un cœur linéaire DMCH (1,4-Dimethylcyclohexane) permettant une présentation en peigne des quatre bras galactosides. Ils ont un linker 1 type pro ou DMCH et un linker 2 possédant différents cycles aromatiques comme le phényle, le biphényle et le naphtyle. Enfin, le bras est rattaché au cœur du galactocluster par une liaison phosphodiester ou phosphorothioate (PS) et le galactose au bras par une liaison *O*-Gal ou *S*-Gal (Tableau F-2).

Id.	Nom	PS	Linker 1	Linker 2	S-Gal
70	(DMCH-**Pro**TzProNOC**BiPh**-Gal)$_4$	/	Pro	ProNOCBiPh	/
71	(DMCH-**DMCHM**TzProNOC**BiPh**-Gal)$_4$	/	DMCHM	ProNOCBiPh	/
72	(DMCH-**PSPro**TzProNOC**BiPh**-Gal)$_4$	PS	Pro	ProNOCBiPh	/
73	(DMCH-**PSDMCHM**TzProNOC**BiPh**-Gal)$_4$	PS	DMCHM	ProNOCBiPh	/
74	(DMCH-**Pro**TzProNOC**Napht**-Gal)$_4$	/	Pro	ProNOCNapth	/
75	(DMCH-**DMCHM**TzProNOC**Napht**-Gal)$_4$	/	DMCHM	ProNOCNapth	/
76	(DMCH-**PSPro**TzProNOC**Napht**-Gal)$_4$	PS	Pro	ProNOCNapth	/
77	(DMCH-**PSDMCHM**TzProNOC**Napht**-Gal)$_4$	PS	DMCHM	ProNOCNapth	/
78	(DMCH-**Pro**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$	/	Pro	AcNPh	/
79	(DMCH-**DMCHM**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$	/	DMCHM	AcNPh	/
80	(DMCH-**PSPro**TzAcN**Ph**-Gal)$_4$	PS	Pro	AcNPh	/
81	(DMCH-**PSDMCHM**TzAcN**Ph**-Gal)	PS	DMCHM	AcNPh	/
82	(DMCH-**Pro**TzAcN**Ph**-**S**Gal)$_4$	/	Pro	AcNPh	S
83	(DMCH-**DMCHM**TzAcN**Ph**-**S**Gal)$_4$	/	DMCHM	AcNPh	S
84	(DMCH-**PSPro**TzAcN**Ph**-**S**Gal)$_4$	PS	Pro	AcNPh	S
85	(DMCH-**PSDMCHM**TzAcN**Ph**-**S**Gal)$_4$	PS	DMCHM	AcNPh	S

Tableau F-2 : Galactoclusters étudiés.

Etude d'affinité sur le glycocluster-microarray

L'affinité de ces différents galactoclusters a été mesurée par des mesures du signal de fluorescence de l'Alexa647_PA-IL interagissant avec les galactoclusters immobilisés sur le microarray.

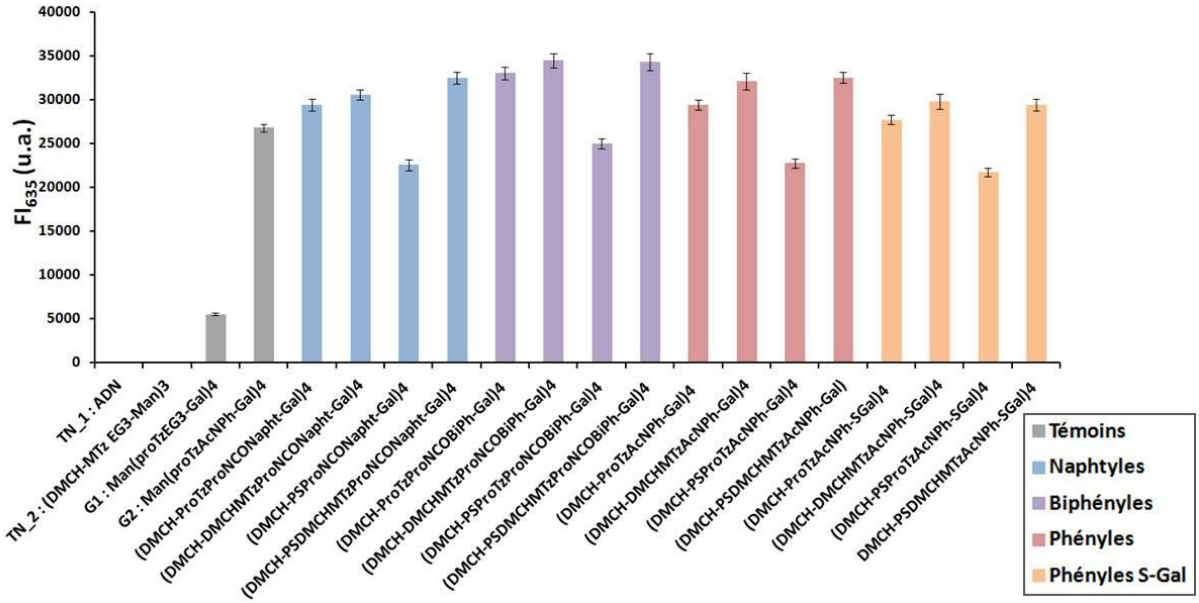


Figure F-3 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Bien que les différences de FI_{635} ne soient pas très grandes, un linker 1 type DMCH est légèrement plus favorable qu'un linker 1 type pro pour interagir avec PA-IL. De plus, un linker 2 type Biphényle permet d'obtenir une plus forte FI_{635} que le napthyle puis que le phényle. Pour les galactoclusters avec un linker 1 type pro, la liaison phosphorothioate entraine une forte diminution de la FI_{635} par rapport à une liaison phosphodiester, et donc déstabilise l'interaction PA-IL. En revanche, lorsque L1 = DMCH, la liaison phosphorothioate n'influence pas l'interaction avec PA-IL. De même, une liaison *S*-Gal n'affecte pas l'interaction avec PA-IL par rapport à une liaison *O*-Gal.

Enfin, à l'exception des galactoclusters type (DMCH-**PSPro**TzL2-Gal)$_4$, les galactoclusters possédent tous une FI_{635} équivalente ou supérieure au galactocluster G2, Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$. La topologie permettant la présentation linéaire et en peigne des galactosides semble donc aussi être favorable pour permettre une bonne interaction avec PA-IL. Des mesures de K_d sont en cours pour venir compléter l'analyse et comparer leur affinité vis-à-vis de PA-IL avec celles des galactoclusters à cœur mannose possédant le même type de linker 2 aromatique.

F.1.3. Galactoclusters possédant un hétéroatome de soufre : L1-S-L2

Galactoclusters étudiés

Les 9 galactoclusters étudiés présentent tous un cœur mannose permettant une présentation centrée de quatre bras galactosides. Ils ont un linker 1 aliphatique plus ou moins long et flexible type pro, EG_2 ou EG_4. Et un linker 2 aliphatique type MAcNpro ou $MAcNEG_3$ ou aromatique type AcNPh. A l'instar de tous les galactoclusters étudiés jusqu'ici, ils possèdent un atome de soufre entre le linker 1 et 2 et non pas un triazole (Tableau F-3).

Id.	Nom	Linker 1	Linker 2
52	Man(**hex**SMAcN**pro**-Gal)$_4$	Hex	MAcNpro
53	Man(**hex**SMAcN**EG$_3$**-Gal)$_4$	Hex	$MAcNEG_3$
54	Man(**hex**SAcN**Ph**-Gal)$_4$	Hex	AcNPh
55	Man(**EG$_2$**SMAcN**pro**-Gal)$_4$	EG_2	MAcNpro
56	Man(**EG$_2$**SMAcN**EG$_3$**-Gal)$_4$	EG_2	$MAcNEG_3$
57	Man(**EG$_2$**SAcN**Ph**-Gal)$_4$	EG_2	AcNPh
61	Man(**EG$_4$**SMAcN**pro**-Gal)$_4$	EG_4	MAcNpro
62	Man(**EG$_4$**SMAcN**EG$_3$**-Gal)$_4$	EG_4	$MAcNEG_3$
63	Man(**EG$_4$**SAcN**Ph**-Gal)$_4$	EG_4	AcNPh

Tableau F-3 : Galactoclusters étudiés.

Etude d'affinité sur le glycocluster-microarray

L'affinité de ces différents galactoclusters a été mesurée par des mesures du signal de fluorescence de l'Alexa647_PA-IL interagissant avec les galactoclusters immobilisés sur le microarray.

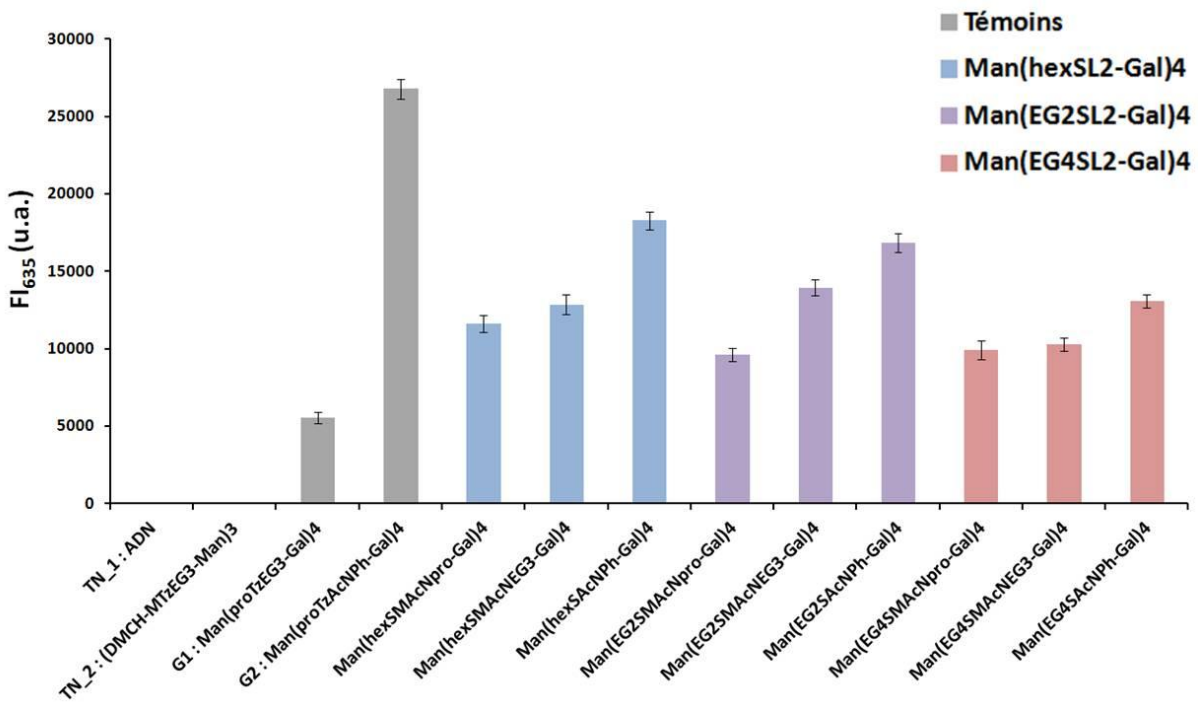


Figure F-4 : Moyenne des FI_{635} de l'Alexa647_PA-IL pour les différents galactoclusters. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 32 répétitions.

Les galactoclusters avec un linker 1 type pro ou EG_2 ont une FI_{635} plus élevée que ceux avec un linker 1 type EG_4. Un linker 1 plus court (chaine de 6 atomes) est donc plus favorable pour interagir avec PA-IL qu'un plus long (chaine de 12 atomes). Ensuite, comme observé avec les galactoclusters possédant des bras L1-Tz-L2, la FI_{635}, et donc l'interaction avec PA-IL, augmente lorsque le linker 2 est un aromatique.

Enfin, tous les galactoclusters type L1-S-L2 ont une FI_{635} inférieure au galactocluster G2 Man(proTzAcNPh-Gal)$_4$ signifiant qu'ils ont moins d'affinité pour PA-IL que ce dernier. Une étude par modélisation moléculaire a montré que le cycle triazole du galactoside EG_2**Tz**AcNPh-Gal était impliqué dans une interaction pseudo π-stacking (T-shaped) avec le résidu Pro51 de PA-IL, ce qui permettait de mieux stabiliser le complexe par rapport au galactoside EG_2**S**AcNPh-Gal (Figure F-5). Ces résultats sont publiés dans (Ligeour et al., 2014).

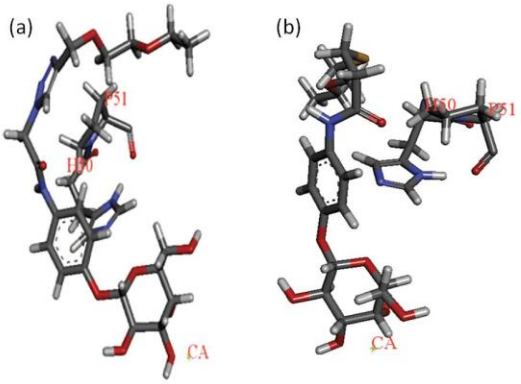


*Figure F-5 : Modélisation des interactions des galactosides EG$_2$**Tz**AcNPh-Gal (a) et EG$_2$**S**AcNPh-Gal (b) avec les résidus His50 et Pro51 de PA-IL.*

F.2. Résultats concernant la lectine PA-IIL

F.2.1. Galactoclusters possédant différentes topologies

Galactoclusters étudiés

Les 9 galactoclusters étudiés ici varient en fonction de leur cœur et de la valence qui y est associée. Ils présentent tous un linker 1 type Pro ou EG$_2$M et un linker 2 type EG$_3$. Différents cœurs permettant deux topologies ont été étudiés :

- Le cœur Mannitol pour une présentation linéaire, alternée et en couronne de 5 à 10 bras portant les galactoses (Figure F-1b)
- Les cœurs Arabinose, Xylose et Ribose (Pentose) pour une présentation centrée de 3 bras portant les galactoses (Figure F-1d)

Les noms des fucoclusters étudiés sont présentés dans le tableau F-4.

Id.	Nom	Cœur	L1TzL2	Valence
111	**Mannitol**(**pro**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_5$	Mannitol	proTzEG$_3$	5
110	**Mannitol**(**EG$_2$M**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_5$	Mannitol	EG$_2$MTzEG$_3$	5
112	**Mannitol**[Thme(**M**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_2$]$_5$	Mannitol	MTzEG$_3$	10
113	**Ribo**(**pro**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_3$	Ribo	proTzEG$_3$	3
114	**Ribo**(**EG$_2$M**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_3$	Ribo	EG$_2$MTzEG$_3$	3
124	**Ara**(**pro**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_3$	Ara	proTzEG$_3$	3
125	**Ara**(**EG$_2$M**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_3$	Ara	EG$_2$MTzEG$_3$	3
134	**Xylo**(**pro**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_3$	Xylo	proTzEG$_3$	3
135	**Xylo**(**EG$_2$M**Tz**EG$_3$**-Fuc)$_3$	Xylo	EG$_2$MTzEG$_3$	3

Tableau F-4 : Galactoclusters étudiés.

Etude d'affinité sur le glycocluster-microarray

Cette étude d'affinité de différentes topologies de fucoclusters s'inscrit dans la suite des travaux effectués pendant la thèse du Dr. Alice Goudot où une première évaluation de leur affinité avait été faite par des mesures de fluorescence et d'IC_{50} sur le microarray. Cette étude a été complétée par une mesure de la valeur de la constante de dissociation (K_d) sur le microarray (Figure F-6).

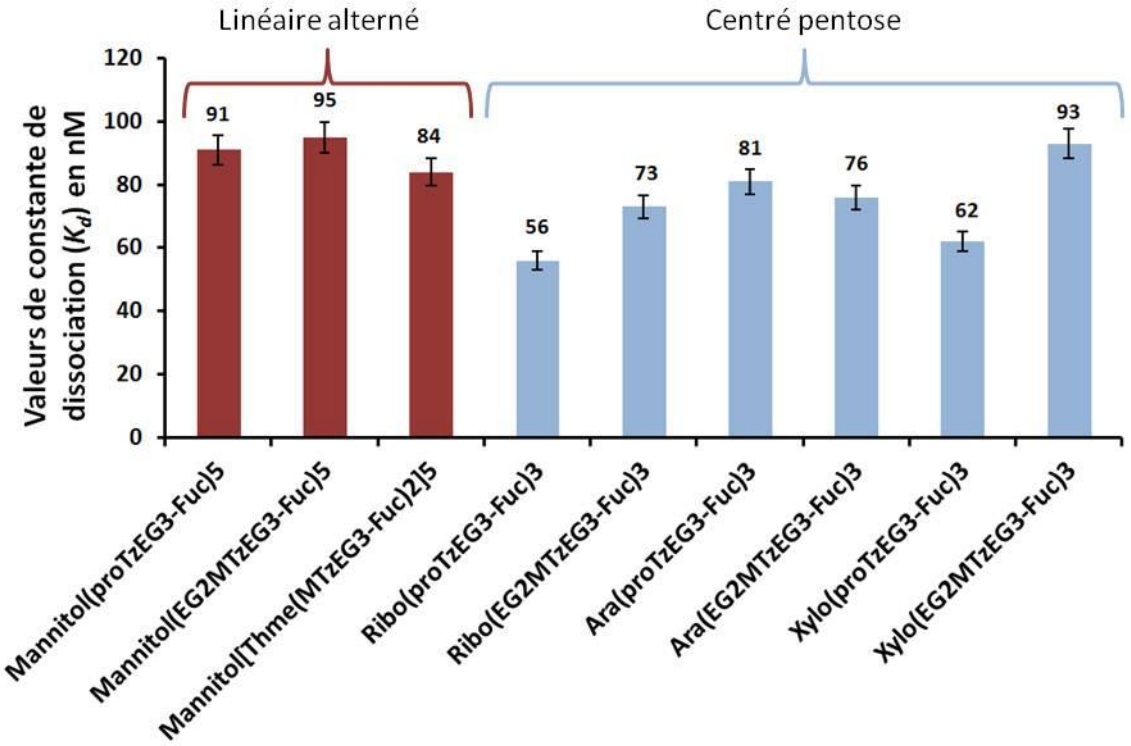


Figure F-6 : Constante de dissociation des différents fucoclusters étudiés ici. Les barres d'erreur représentent une erreur de 10 %.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la thèse du Dr. Alice Goudot et sont publiés (Ligeour et al., 2015a).

De manière générale, les fucoclusters possédant un linker 1 plus flexible, EG_2M, possèdent moins d'affinité pour PA-IIL que ceux possédant le linker 1 type pro.

Pour les glycoclusters à cœur linéaire alterné, l'augmentation de la valence n'influence pas l'interaction avec PA-IIL. En revanche, une diminution de la valence à 3 et une présentation centrée (cœurs pentose) permet de diminuer la valeur de K_d et ainsi augmenter l'interaction avec PA-IIL. C'est notamment le cas pour les fucoclusters Ribo(proTzEG$_3$-Fuc)$_3$ et Xylo(proTzEG$_3$-Fuc)$_3$. Nous avons vu dans le chapitre 5 que l'augmentation d'affinité avec PA-IIL ne semble pas attribuée à un effet chélate. Il peut donc être supposé qu'avec ces deux fucoclusters la présentation centrée et moins encombrée des bras (par rapport à une valence plus élevée) permet une meilleure accessibilité à PA-IIL.

Liste des publications et communications

21, rue du Commandant Fuzier
69003 Lyon, France
+33 (0)6 88 07 08 66
lucie.dupin26@gmail.com

Lucie Dupin

Expériences professionnelles

2013-2016 (3 ans) **Doctorante et Ingénieur d'études**, INL, ECL, Lyon, France
Validation et criblage de nouvelles molécules anti-infectieuses sur microarray : applications à *Pseudomonas aeruginosa*

2011-2012 (13 mois) **Assistante de recherche en analytique**, Merck Serono S.A., Genève, Suisse
Développement de méthodes HPLC et contrôle qualité des protéines dédiées à la recherche.

2011 (6 mois) **Stage de recherche en « Target Discovery »**, Merck Serono S.A., Genève, Suisse
Caractérisation par Western-Blot et LC-MS/MS d'un récepteur nucléaire.

2010 (3 mois) **Stage de recherche en biochimie**, Walid A. Houry Laboratory, Toronto, Canada
Production hétérologue de protéines et caractérisation par cristallographie.

2009 (2 mois) **Stage en contrôle qualité agroalimentaire**, Délifruits, Margès
Contrôle microbiologique et physico-chimique des produits finis.

Formation

2016 **Doctorat** en Biochimie et Chimie de surface, Université de Lyon, Ecole Centrale de Lyon (ECL), Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL), Lyon.

2011 **Diplôme d'ingénieur** en Génie Biologique, Polytech (ex-CUST), Clermont-Ferrand.

2008 **Licence** de Biologie Générale, Université Joseph-Fourier, Grenoble.

Compétences générales

Langue **Anglais :** courant, TOEIC 845 ; **Espagnol :** notions.

Informatique MS office, Outils de la bioinformatique.

Activités liés au doctorat

Enseignement Monitrice de travaux-pratiques de Chimie **(76 h)**.

Encadrement Maitre de stage d'étudiants du master international Nanoscale Engineering (3 x 2 mois).

Vie associative Membre du bureau de l'association des doctorants de l'Ecole Centrale de Lyon en charge du secrétariat et de l'organisation de rencontres entre doctorants (cafés thématiques, journée de remise des diplômes, …).

Publications

L. Dupin, F. Zuttion, T. Géhin, A. Meyer, M. Phaner-Goutorbe, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, F. Morvan, Y. Chevolot. Effects of the Surface Densities of Glycoclusters on the Determination of Their IC_{50} and K_d Value Determination by Using a Microarray. ChemBioChem, 16 : 2329-2336, 2015.

C. Ligeour, **L. Dupin**, A. Angeli, G. Vergoten, S. Vidal, A. Meyer, E; Souteyrand, J.J. Vasseur, Y. Chevolot, F. Morvan. Importance of topology for glycocluster binding to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia ambifaria* bacterial lectins. Organic & Biomolecular Chemistry, 13 : 11244-11254, 2015.

C. Ligeour, O. Vidal, **L. Dupin**, F. Casoni, E. Gillon, A. Meyer, S. Vidal, G. Vergoten, J. Lacroix, E. Souteyrand, A. Imberty, J.J. Vasseur, Y. Chevolot, F. Morvan. Mannose-centered aromatic galactoclusters inhibit the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Organic & Biomolecular Chemistry, 13 : 8433-8444, 2015.

F. Casoni, **L. Dupin**, G. Vergoten, A. Meyer, C. Ligeour, T. Géhin, O. Vidal, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, Y. Chevolot, F. Morvan. Influence of the aromatic aglycon of galactoclusters on the binding of LecA: Case study with O-phenyl, S-phenyl, Obenzyl, S-benzyl, O-biphenyl and O-naphthyl aglycons. Organic & Biomolecular Chemistry , 12 : 9166-9179, 2014.

C. Ligeour, **L. Dupin**, A. Marra, G. Vergoten, A. Meyer, A. Dondoni, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, Y. Chevolot, F. Morvan. Synthesis of Galactoclusters by Metal-Free Thiol "Click Chemistry" and Their Binding Affinities for *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA. European Journal of Organic Chemistry, 7621–7630, 2014.

Communications scientifiques

L. Dupin, A. Meyer, O. Vidal, E. Souteyrand, C. Ligeour, E. Laurenceau, G. Vergoten, J. J. Vasseur, S. Vidal, T. Géhin, F. Morvan, Y. Chevolot. Screening and study on microarray of anti-infectious molecules targeting *Pseudomonas aeruginosa* **(Communication orale, Prix de la meilleure présentation)**. *La journée des doctorants de l'INL,* Ecully, France, 15 -16 octobre 2015.

C. Ligeour, **L. Dupin**, O. Vidal, G. Vergoten, A. Meyer, T. Géhin, S. Vidal, A. Imberty, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, Y. Chevolot, F. Morvan. Innovative Strategy to Discover Glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* using Glycoarray **(Communication orale)**. *11th International Meeting of the Portuguese Carbohydrate Chemistry Group*, Glupor 11, Visue, Portugal, 6 - 10 septembre 2015.

L. Dupin, F. Zuttion, M. Phaner-Goutorbe, A. Meyer, T. Géhin, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolot. Impact de la densité de surface en glycocluster sur l'étude des interactions lectine / glycocluster sur biopuce **(Communication orale)**. Colloque de Recherche Inter Ecoles Centrales, Lille, France, 8 - 12 juin 2015.

L. Dupin, G. Vergoten, F. Zuttion, L. Renaud, S. Vidal, A. Angeli, E. Laurenceau, J.J. Vasseur, T.

Géhin, A. Meyer, M. Phaner-Goutorbe, E. Souteyrand, O. Vidal, F. Morvan, Y. Chevolot. Study of glycocluster/lectin interactions on microarray: impact of glycoclusters surface density **(Communication orale)**. 4th International Conference on Bio-Sensing Technology, Lisbonne, Portugal, 10 - 13 mai 2015.

L. Dupin, F. Casoni, G. Vergoten, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, E. Laurenceau, F. Morvan, A. Meyer, T. Géhin, O. Vidal, Y. Chevolot. Etude sur biopuce et modélisation moléculaire de l'influence de l'aglycone aromatique sur les interactions de galactoclusters avec la lectine PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa* **(Communication orale)**. 18ème Journée Scientifique du Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences, Lyon, France, 25 février 2015.

L. Dupin, T. Gehin, A. Meyer, E. Souteyrand, F. Casoni, E. Laurenceau, G. Vergoten, J. J. Vasseur, O. Vidal, C. Ligeour, B. Darblade, F. Morvan, Y. Chevolot. Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation: a DDI-microarray study of lectin/glycoclusters interactions **(Poster)**. *La journée des doctorants de l'INL*, Ecully, France, 2 - 3 octobre 2014.

L. Dupin, A. Meyer, E. Souteyrand, F. Morvan, E. Laurenceau, G. Vergoten, J.J. Vasseur, O. Vidal, F. Casoni, C. Ligeour, B. Darblade, T. Géhin, Y. Chevolot. Etude de l'interaction de PA-IL lectine soluble de Pseudomonas aeruginosa sur DDI-microarray : une approche anti-biofilm **(Poster)**. 6ème colloque UMI-LN2, Allevard les Bains, France, 9-10 juillet 2014.

L. Dupin, F. Casoni, G. Vergoten, A. Goudot, C. Ligeour, A. Meyer, T. Géhin, E. Laurenceau, E. Souteyrand, O. Vidal, J.J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolot. Etude par DDI-microsystème de galactoclusters interagissant avec PA-IL de Pseudomonas aeruginosa : Influence de l'aglycone aromatique **(Communication orale)**. Colloque de Recherche Inter-Ecoles Centrales, Ecully, France, 2 – 6 juin 2014.

F. Morvan, F. Casoni, **L. Dupin**, G. Vergoten, A. Meyer, O. Vidal, E. Souteyrand, Y. Chevolot, J.J. Vasseur. Influence de l'aglycone aromatique de galactomimétiques sur l'affinité de la lectine I de *Pseudomonas aeruginosa* (LecA) **(Communication orale)**. 25ème Journées du Groupe Français des Glycosciences, Paris, France, 12 - 15 Mai 2014.

L. Dupin, A. Goudot, E. Souteyrand, O. Vidal, F. Morvan, E. Laurenceau, S. Vidal, J.J. Vasseur, F. Casoni, C. Ligeour, A. Meyer, T. Géhin, Y. Chevolot. Criblage d'une banque de glycoclusters sur DDI-glycoarray : Application à *Pseudomonas aeruginosa* **(Communication orale)**. 15ème Rencontre de Chimie Organique Biologique, Aussois, France, 23 – 27 mars 2014.

F. Casoni, **L. Dupin**, A. Meyer, Y. Chevolot, O. Vidal, G. Vergoten, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, F. Morvan. Influence de l'aglycone aromatique de galactomimétiques pour l'affinité de la lectine I de Pseudomonas aeruginosa (PA-IL) **(Poster)**. 15ème Rencontre de Chimie Organique Biologique, Aussois, France, 23 – 27 mars 2014.

L. Dupin, C. Ligeour, A. Goudot, E. Souteyrand, E. Laurenceau, S. Vidal, F. Morvan, J.J. Vasseur, A. Meyer, T. Géhin, O. Vidal, Y. Chevolot. Utilisation de biopuces à glycoclusters pour la découverte de nouveaux agents anti-infectieux contre Pseudomonas aeruginosa **(Communication orale)**. 17ème Journée Scientifique du GLGS, Lyon, France, 05 décembre 2013.

F. Casoni, **L. Dupin**, A. Meyer, S. Vidal, Y. Chevolot, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, F. Morvan. Conception d'ADN-glycomimes fonctionnalisés avec différents résidus galactose-aromatiques

comme inhibiteurs potentiels de l'adhésion cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa* **(Communication orale).** 17ème Journée Scientifique du GLGS, Lyon, France, 05 décembre 2013.

L. Dupin, E. Souteyrand, J.J. Vasseur, A. Goudot, S. Vidal, F. Casoni, C. Ligeour, O. Vidal, E. Laurenceau, A. Meyer, T. Géhin, F. Morvan, Y. Chevolot. DNA-Directed Immobilisation of glycoclusters on microarray: A tool to characterize Lectin/Glycoclusters interactions **(Poster)**. *E*ntretiens Jacques Cartier "Santé, Biologie, Micronanosystèmes", Lyon France, 25 – 26 novembre 2013.

dernière page de la thèse

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 7 août 2006,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur Y. CHEVOLOT

et les rapports de

M. R. BOUKHERROUB
Directeur de Recherche CNRS - Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) - UMR CNRS 8520 - Université de Lille 1 - Avenue Poincaré CS 60069 - 59652 VILLENEUVE D'ASCQ

et de

M. O. RENAUDET
Professeur - Département de chimie moléculaire - Université Grenoble-Alpes
Bâtiment Nanobio - 570 rue de la Chimie - BP 53 - 38041 GRENOBLE cedex 9

Madame DUPIN Lucie

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE

Fait à Ecully, le 24 mai 2016

P/Le directeur de l'E.C.L.
La directrice des Etudes

ECOLE CENTRALE DE LYON
Service Scolarité
ECULLY

M-A. GALLAND

Auteur : Lucie Dupin

Année : 2016

Résumé : *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est la troisième bactérie impliquée dans les maladies nosocomiales et est la principale cause de mortalité des patients atteints de la mucoviscidose. PA est résistante à la plupart des traitements antibiotiques. Trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques est devenu un enjeu majeur de santé publique, l'une d'entre elles est l'inhibition de facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, les lectines sont des protéines impliquées dans l'adhésion et la formation de biofilm via des interactions avec des sucres (PA-IL, PA-IIL, FliC, FliD, PilA, PilY1 et CupB6).

Le but de ce travail est donc de trouver des leurres moléculaires ayant une forte affinité pour ces lectines. Ceux-ci sont des motifs saccharidiques présentés de façon multivalente : glycoclusters. De part leur grande diversité structurale et leur faible quantité, un outil de criblage innovant a été développé qui consiste en une lame de verre microstructurée : le glycocluster-microarray. Les glycoclusters sont immobilisés de manière ordonnée par DNA Directed Immobilization (DDI). Deux méthodes de criblage ont été développées grâce à cet outils : 1) le criblage en solution et par compétition d'une bibliothèque de motifs saccharidiques et 2) le criblage d'une bibliothèque de glycoclusters immobilisés sur le microarray. Avec cet outil, des protocoles de mesures d'IC_{50} et de K_d ont aussi été fiabilisés pour caractériser les meilleurs candidats inhibiteurs des lectines. Le glycocluster-microarray présente l'avantage de n'utiliser qu'une très faible quantité de matériel (quelques picomoles) et permet de réaliser diverses analyses en parallèle.

Afin de valider cet outil, une étude sur l'impact de la densité de surface en glycocluster a été menée. Le criblage de plus de 150 motifs saccharidiques a permis de sélectionner ceux ayant une forte affinité pour les lectines. L'analyse sur microarray complétée par de la modélisation moléculaire d'une bibliothèque de glycoclusters, possédant ces motifs et différentes topologies, valences et propriétés (aromaticité, charge,…), a permis d'identifier les paramètres clés dirigeant les relations structure-affinité. Une activité anti-biofilm chez PA a été démontrée avec les meilleurs glycoclusters ciblant PA-IL.

Tester l'activité *in vivo*, chez l'animal, des meilleurs candidats est une voie à explorer. Cibler d'autres lectines comme celles présentes sur le flagelle et les *pili* de PA et notamment impliquées dans son adhésion précoce est aussi une voie à développer. Pour cela, des tests préliminaires ont été présentés et d'autres sont en cours faisant appel à l'utilisation de bactéries entières ainsi qu'à une détection sans marquage des lectines.

Mots-clés : interaction glycocluster/lectine, microarray, DNA Directed Immobilization (DDI), modélisation moléculaire.

Title: Validation and screening of new anti-infective molecules on microarray: applications to *Pseudomonas aeruginosa*.

Summary: *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is the third pathogen involved in nosocomial diseases and the major cause of mortality of cystic fibrosis patients. PA develops resistance to antibiotics treatments. And so, developing new therapeutic strategies is a public health issue. One of the promising strategies is to inhibit virulence factors involved in the adhesion and the biofilm formation of PA. Some of these virulence factors are lectins which interact with sugars (PA-IL, PA-IIL, FliC, FliD, PilA, PilY1 and CupB6).

The goal of this work is to find molecular decoys which have a strong affinity for these lectins. These are saccharidic units with a multivalent display: glycoclusters. An innovative screening tool has been developed: the glycocluster-microarray, to study lectin/glycocluster interactions. It is a microstructured glass slide where glycoclusters are immobilized by DNA Directed Immobilization (DDI). Two screening methods have been developed with this microarray: 1) the screening in solution and by competition of a saccharidic units library and 2) the screening of a glycoclusters library immobilized on the microarray. Protocols of IC_{50} and K_d measurements have also been developed with this tool to characterize the best lectins inhibitors. This tool allows to use few amount of material (few picomoles) and to do parallel analysis.

To validate the microarray, a study of the impact of glycoclusters surface density has been done. The screening of more than 150 saccharidic units allowed the selection of the ones that display the best affinity for lectins. The analysis, on microarray and molecular simulations, of the glycoclusters library displaying these saccharidic units and several topologies, valences and properties (aromaticity, charge,…) enable to identify key parameters of structure-affinity relationships. An anti-biofilm activity has been observed for the best glycoclusters targeting PA-IL.

Testing *in vivo* activity of these best candidates will be explored. Targeting others lectins such as the ones on the flagella and *pili* of PA and involved in the early adhesion needs also to be developed. To this end, preliminary tests have been showed and some are in progress.

Key words: glycocluster/lectin interaction, microarray, DNA Directed Immobilization (DDI), molecular simulations.